

UNTERSUCHUNGEN ZUR SYNTHESE
EINIGER PEPTIDPENICILLINE

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hanfried Arnold
aus Berlin

1969
—

**UNTERSUCHUNGEN ZUR SYNTHESE
EINIGER PEPTIDPENICILLINE**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Hanfried Arnold

aus Berlin



1. Referent: Prof. Dr. K.-H. Frömming

2. Referent: Prof. Dr. W. Broser

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.1968

Tag der Promotion:

17. FEB. 1969

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. Frömming durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. K.-H. Frömming für die Überlassung des Themas der Dissertation und für seine stete Bereitschaft zur Diskussion aller Probleme, die sich im Zusammenhang mit dieser Arbeit ergaben.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. G. Schenck und Herrn Prof. Dr. F. Eiden, den Direktoren des Pharmazeutischen Institutes, die durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der zahlreichen Hilfsmittel mir die Arbeit an diesem Institut ermöglichten.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I. Einleitung und Problemstellung	7
II. Synthese der Penicilline	9
1. Allgemeine Synthese semisynthetischer Penicilline	9
2. Vergleich der Kupplungsmethoden für Peptidpenicilline	10
3. Schutzgruppen	11
4. Synthese der Peptidpenicilline	11
III. Reinigung der Penicilline	14
1. Zersetzungsprodukte und analytische Verfahren	14
2. Reinigungsversuche an Peptidpenicillinen	19
a) Abspaltung der Schutzgruppe mit anschließender Reinigung	20
b) Reinigung der Cbo-Dipeptidpenicilline	24
IV. Stabilitätsuntersuchungen	25
1. unter Synthesebedingungen	25
a) Reaktionszeit während der Kupplung	26
b) Stabilität in Lösungsmitteln	26
2. unter Reinigungsbedingungen	28
a) in wässrigen Lösungen (pH-Abhängigkeit)	28
b) in organischen Lösungsmitteln	29
3. Stabilität in fester Form	36
4. Diskussion	38
V. Zusammenfassung	40
VI. Experimenteller Teil	41
1. Allgemeine Angaben	41
2. Cbo-Aminosäuren	41
3. Cbo-Dipeptide	44
4. Cbo-Dipeptidpenicilline	52
5. Hydrierversuche an Dipeptiden und Dipeptidpenicillinen	62

6. Analytische Verfahren

67

a) Reinheitsbestimmung der Penicilline nach
der Hydroxylamin-Methode

67

b) Chromatographie

68

c) Bestimmung der Sorptionsisotherme

69

VII. Literaturverzeichnis

70

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Seit der Isolierung der 6-Aminopenicillansäure (6-APS) und ihrer großtechnischen Gewinnung aus Penicillin G durch BATCHELOR, DOYLE und Mitarbeiter (1) im Jahre 1959 setzte eine Flut von Veröffentlichungen neuer halbsynthetischer Penicilline ein. Von diesen über 2000 neuen Verbindungen, die durch Acylierung der 6-APS gewonnen wurden, konnten aber nur wenige in ihrer Wirksamkeit mit dem bekannten Penicillin G konkurrieren. Ein ganz besonders interessantes Penicillin fanden DOYLE und Mitarbeiter (2-4) in der 6-(D- α -Aminophenylacetamido)-penicillansäure, dem Ampicillin.

Diese Verbindung zeigt - im Gegensatz zu dem entsprechenden L-Antipoden - eine charakteristische Wirkung gegen gramnegative Bakterien, ähnlich wie das Cephalosporin N. Diese Wirkung wird wesentlich auf das Vorliegen einer freien Aminogruppe zurückgeführt. Daneben ist die für Penicilline erhebliche Säurestabilität zu erwähnen. Gegen Penicillinaseeinwirkung ist es jedoch labil. (5-7)

Es interessierte uns nun, ob bei anderen Aminosäurederivaten der 6-APS ähnliche Wirkungen wie beim Ampicillin zu beobachten sind, das heißt, ob bei Ersatz der α -Aminophenyllessigsäure durch andere Aminosäuren ebenfalls eine Wirkung gegen gramnegative Bakterien vorliegt. Darüberhinaus sollte in späteren Untersuchungen geklärt werden, ob diese Wirkung konfigurationsgebunden ist.

Die Untersuchung des letzten Problems setzte voraus, daß die mit Aminosäuren acylierten 6-APS-Derivate nicht nur in weitgehend angereicherter Form, sondern kristallin als chemisch reine Substanzen in ihren optischen Antipoden zu erhalten sind.

So ergab sich für die vorliegende Arbeit das Ziel, die Möglichkeit der Synthese reiner Peptid-Penicilline zu

untersuchen, da erst mit diesen mikrobiologische Untersuchungen sinnvoll erscheinen.

Während der ersten Untersuchungen wurden aus Patentschriften Penicilline bekannt, die durch Acylierung der 6-APS mit den wichtigsten, natürlich vorkommenden Aminosäuren dargestellt wurden (2). Die hier erhaltenen Verbindungen waren nicht analysenrein, das galt auch für die entsprechenden Carbobenzoxy (Cbo)-Verbindungen.

In diesen Patenten wird keine Aussage über die chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser Penicilline gemacht. Die Autoren beschränken sich nur auf die Angabe des Reinheitsgrades, der mikrobiologisch ermittelt wurde, und auf die Bestimmung der mikrobiologischen Aktivität gegen verschiedene Bakterienstämme. Dagegen gelang es lediglich, das Ampicillin als chemisch reine Substanz herzustellen. Das ist wohl auch der Grund dafür, daß diese Verbindung in allen Variationen der Peptidsynthese untersucht wurde.

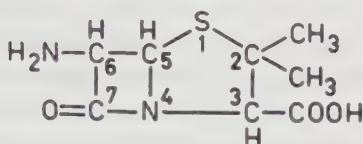
Da nun die einfachen Aminosäurederivate der 6-APS bekannt waren, sollte versucht werden, einige dieser Verbindungen als chemisch reine Substanzen zu erhalten. Weiterhin sollten noch unbekannte Dipeptid-Penicilline synthetisiert und an ihnen die mikrobiologische Wirksamkeit untersucht werden.

Da es bei der Partialsynthese häufig durch Aufspaltung des β -Lactam-Ringes zu einer Verunreinigung und gleichzeitig zu einer Verminderung der mikrobiologischen Aktivität der Penicilline kommt, war es weiter von Interesse, die Abhängigkeit der Stabilität von einigen Reaktionsbedingungen zu untersuchen. Es mußte während der Synthese versucht werden, den Anfall von Abbauprodukten möglichst gering zu halten. Die hydrolytisch gebildeten Abbauprodukte sind durch die teilweise sehr ähnlichen physikalischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften schwer von den Reaktionsprodukten abzutrennen.

II. SYNTHESE DER PENICILLINE

1. Allgemeine Synthese semisynthetischer Penicilline.

Alle semisynthetischen Penicilline werden durch N-Acylierung der 6-Aminopenicillansäure dargestellt.



Die Acylierung erfolgt in der Regel durch Umsetzung der 6-APS mit Säurechloriden oder mit gemischten Anhydriden. Da es sich um eine Amidbildung handelt, wurden nach und nach auch andere Kupplungsmethoden der Peptid-Chemie angewandt, so z.B. die Carbodiimid-Methode (8), das Azid-Verfahren (9) oder bei Verknüpfung mit Aminosäuren die Methode über das N-Carbonsäureanhydrid (10), bei der keine Schutzgruppe benötigt wird.

Die 6-APS wird bei allen Verfahren als Salz eingesetzt, da bei der Verwendung von Estern die nachfolgende Verseifung mit Alkali eine Inaktivierung des Penicillins durch Aufspaltung des β -Lactamringes bewirkt. So wird das 6-APS-Salz einer organischen Base (z.B. Triäthylamin) in organischen Lösungsmitteln oder das Alkalisalz in wässrigen Lösungsmitteln verwendet. Eine Ausnahme bildet der von GLOMBITZA (11) eingeführte Trimethylsilylester der 6-APS, der sich außerordentlich leicht hydrolytisch abspalten läßt.

2. Vergleich der Kupplungsmethoden für Peptidpenicilline.

Bei der Wahl der Kupplungsmethode für Penicilline aus Aminosäuren oder Peptiden und 6-APS konnte für die Zielsetzung dieser Arbeit nur ein Verfahren herangezogen werden, das möglichst racemisierungsfrei arbeitet.

Das als in dieser Hinsicht besonders sicher geltende Azidverfahren (12, 13) wurde nicht angewandt, da die Reaktions- und Aufarbeitungszeit möglichst kurz gehalten werden sollte, um eine starke Inaktivierung der Penicilline zu vermeiden. In Vorversuchen traten auch Schwierigkeiten bei der Wahl eines geeigneten Lösungsmittels auf. Die später veröffentlichte Methode der Kupplung in wässrigem Medium (9) führte auch nur, wie erwartet, zu sehr unreinen Verbindungen (48 % Reinheit, in mäßiger Ausbeute von 37 %). Aus ähnlichem Grunde sollte auch das Carbodiimidverfahren nicht angewandt werden, da hierbei die Entfernung von Nebenprodukten wie Dicyclohexylharnstoff und evtl. entstehender N-Acylharnstoff die Ausbeute und Reinheit der Penicilline verringert.

Die Methode der gemischten Anhydride schien dagegen für den Syntheseweg geeignet. Eine Racemisierung kann weitgehend durch Einhaltung besonders kurzer Reaktionszeiten, niedriger Temperatur und Vermeidung eines Überschusses der tertiären Base Triäthylamin vermieden werden (14). Die Ausbeuten sind gut. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt darin, daß bei der Kupplung zum Penicillin das Salz der Aminosäurekomponente, also das Triäthylaminsalz der 6-APS, in Chloroform oder in Aceton, das 20 % Wasser enthält, gut löslich ist und verwendet werden kann.

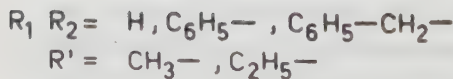
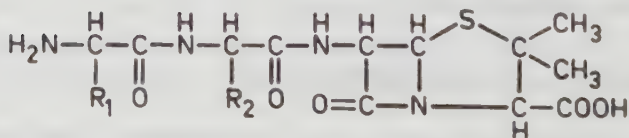
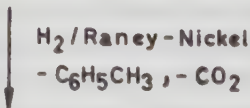
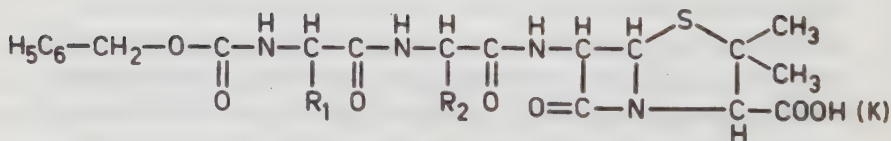
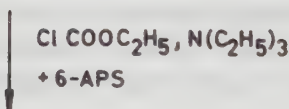
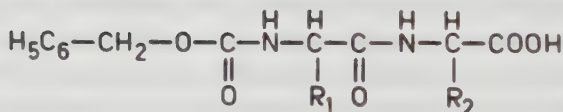
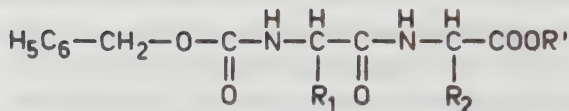
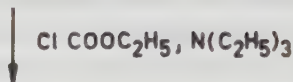
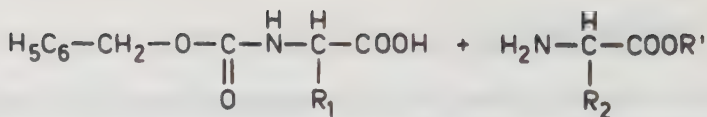
3. Schutzgruppen

Ein weiteres Problem bei den Peptidsynthesen ist die Wahl der geeigneten Schutzgruppe. Sie soll einerseits unter den Synthesebedingungen nicht abspaltbar sein und außerdem gut kristallisierende, nicht racemisierte Acylpeptide ergeben. Andererseits soll sie aber auch nach der Synthese wieder leicht zu entfernen sein. Diese Forderung stößt nun bei den Penicillinen auf Schwierigkeiten. Fast alle der üblichen Peptidschutzgruppen werden nämlich hydrolytisch im sauren oder basischen Medium abgespalten, also unter Bedingungen, in denen die Penicilline ebenfalls aufgespalten werden. Die Carbobenzoxygruppe läßt sich dagegen auch durch katalytische Hydrierung entfernen. Der Nachteil bei diesem Verfahren besteht jedoch bei der Hydrierung von Cbo-geschützten Penicillinen darin, daß durch die Anwesenheit von Schwefel im Penicillinmolekül eine Inaktivierung des verwendeten Edelmetall-Katalysators erfolgt. In einigen Fällen (15, 16) wurde deshalb z.B. das Ampicillin ohne Verwendung von Schutzgruppen dargestellt.

Für die beabsichtigten Peptid- und Penicillinsynthesen erschien der Cbo-Rest unter den bekannten Schutzgruppen die günstigsten Eigenschaften zu besitzen; die Ausgangsstoffe waren allgemein gut kristallisierende Verbindungen, deren optische Antipoden weitgehend bekannt waren. Die Gefahr einer Racemisierung der Peptide während der Kupplung ist ebenfalls gering gegenüber Peptiden mit anderen Schutzgruppen oder den Verfahren, bei denen keine Schutzgruppen benötigt werden.

4. Synthese der Peptidpenicilline

Für die Synthese nach der Anhydridmethode wurde nun der folgende Weg zur Herstellung der Peptid-Penicilline vorgesehen: Kupplung der Cbo-Aminosäuren und Aminosäureesterhydrochloride zu geschützten Dipeptidestern, Verseifung zu den entsprechenden Dipeptidsäuren und Kupplung mit dem Triäthylammoniumsalz der 6-APS mit nachfolgender Abspaltung der Schutzgruppe (s. Schema 1).



Schema 1

Für die Herstellung der Modellsubstanzen wurden die Aminosäuren Glycin, D-, L- und DL-Phenylalanin sowie D- α -Phenylaminoessigsäure eingesetzt; aus ihnen wurden die folgenden Dipeptide dargestellt:

Cbo-glycylglycin
Cbo-glycyl-D-phenylalanin
Cbo-glycyl-L-phenylalanin
Cbo-glycyl-DL-phenylalanin
Cbo-D-phenylalanylglycin
Cbo-L-phenylalanylglycin
Cbo-DL-phenylalanylglycin
Cbo-DL-phenylalanyl-DL-phenylalanin
Cbo-glycyl-D- α -phenylglycin
Cbo-D- α -phenylglycylglycin

Das Cbo-glycyl-D- α -phenylglycin und Cbo-D- α -phenylglycylglycin sind bisher in der Literatur nicht beschrieben worden.

Aus diesen Dipeptiden und einigen Carbobenzoxyaminosäuren wurden die folgenden Penicilline, deren Reinheitsgrad nach dem Hydroxylamin-Test bestimmt wurde, hergestellt:

<u>6-Amidopenicillansäuren</u>	<u>Reinheit</u>
Cbo-glycyl-	85 %
Cbo-glycylglycyl-	56 %
Cbo-L-phenylalanyl-	73 %
Cbo-glycyl-D- α -phenylglycyl-	55 %
Cbo-glycyl-D-phenylalanyl-	65 %
Cbo-glycyl-L-phenylalanyl-	21 %
Cbo-glycyl-DL-phenylalanyl-	50 %
Cbo-D-phenylalanylglycyl-	67 %
Cbo-L-phenylalanylglycyl-	69 %
Cbo-DL-phenylalanylglycyl-	70 %
Cbo-DL-phenylalanyl-DL-phenylalanyl-	53 %

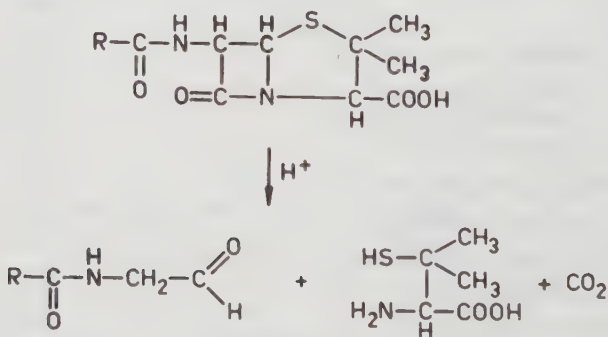
Einige dieser N-geschützten Penicilline zeigten im mikrobiologischen Test eine Wirksamkeit, die es sinnvoll erscheinen ließ, mit gereinigten Cbo-Verbindungen bzw. mit freien Peptidpenicillinen die Abhängigkeit der mikrobiologischen Wirksamkeit von der Konfiguration der Peptidseitenkette zu untersuchen.

III. REINIGUNG DER PENICILLINE =====

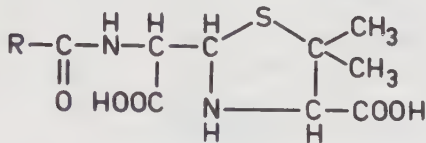
1. Zersetzungsprodukte und analytische Verfahren

Alle Penicilline besitzen als Derivate der 6-Aminopenicillansäure einen an den Thiazolidin-Kern kondensierten β -Lactamring (17). Dieser Vierring ist die labilste Stelle im Penicillinmolekül und bedingt die geringe Beständigkeit gegen Säuren und Alkali.

In der Hitze erfolgt durch saure Hydrolyse eine Spaltung in die drei Teilstücke D-Penicillamin, Penilloaldehyd und Kohlendioxid (19):

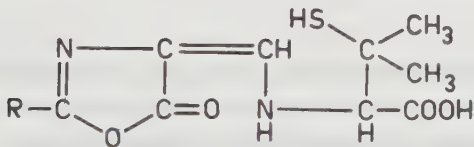


Durch Stehen bei Raumtemperatur in neutraler oder alkalischer Lösung ebenso wie bei Einwirkung des Enzyms Penicillinase tritt eine hydrolytische Aufspaltung des β -Lactam-Ringes zur entsprechenden Penicillosäure ein(19):

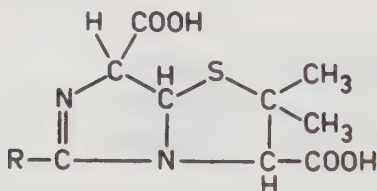


Diese Hydrolyse erfolgt wesentlich leichter bei den Penicillinen als bei anderen, einfacher gebauten β -Lactam-Ringen. Der Grund hierfür wird in der Anwesenheit des Schwefels im benachbarten Thiazolidin-Ring angenommen (20).

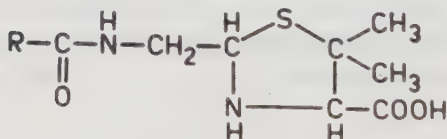
Im neutralen Medium erfolgt die Hydrolyse zur Penicillosäure über die Penicillensäure:



Beim Stehen in stark saurer Lösung bei Raumtemperatur erfolgt Isomerisierung zur Penillsäure, wobei der Lactamring in den stabileren Imidazol-Ring übergeht (19):

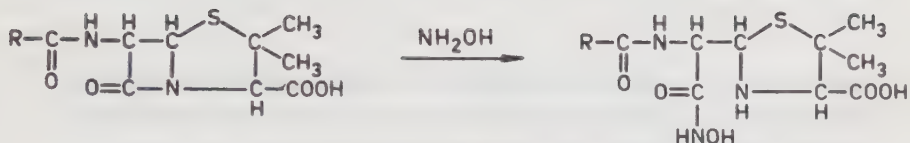


Ein weiteres Spaltprodukt, die Penillosäure, entsteht durch Decarboxylierung der Penicillosäure:



Durch Einwirkung von Alkoholen auf Penicillin erfolgt Solvolyse unter Bildung der entsprechenden α -Penicillo-säureester, mit Aminen entstehen die entsprechenden α -Amide (mit " α " wird der Substituent an der Lactam-Carboxonyl-Gruppe bezeichnet) (21, 22).

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades des Penicillins kann entweder eine mikrobiologische Untersuchung oder die analytische Umsetzung des β -Lactamringes mit Hydroxylamin zur Hydroxamsäure, die mit Eisen (III)-Ionen einen roten Farbkomplex liefert, herangezogen werden (22).



Diese Reaktion wird photometrisch ausgewertet. FORD(23) führte den Vergleich mit einer Blindprobe durch, wobei durch Penicillinase, oder bei halbsynthetischen Penicillinen auch durch Natriumhydroxid eine Aufspaltung des β -Lactamringes erfolgt. Es wird dadurch eine quantitative Aussage ermöglicht, die unabhängig von störenden Reaktionen der Begleitsubstanzen ist.

HENSTOCK (24) sowie BOXER und EVERETT (25) führten Verbesserungen durch Stabilisierung und Intensivierung des Farbkomplexes ein. Eine fortlaufende Penicillin-Bestimmung mit Hydroxylamin direkt aus dem Fermentationsansatz wurde von NIEDERMEYER (26) entwickelt.

Die Konzentration der zu prüfenden Penicilline in Internationalen Einheiten wird aus einer Eichgeraden abgelesen, in der die Absorptionen gegen die Konzentrationen eines Penicillin G-Standards aufgetragen sind. Der Vergleich mit der theoretisch berechneten Konzentration ergibt dann den Reinheitsgrad. Dieses analytische Verfahren wurde zur Reinheitsbestimmung bei den vorliegenden Untersuchungen herangezogen.

Ein weiteres chemisches Verfahren ist die jodometrische Bestimmungsmethode (22). Sie wird jedoch in der Regel nur bei Reinheitsbestimmungen bekannter Penicilline in pharma-

zeutischen Präparaten angewandt. Sie beruht auf der Oxydation der beiden Spaltprodukte Penicillamin und Penaldinsäure. Der Reaktionsablauf ist jedoch noch nicht vollständig gesichert (27).

Daneben spielt zur analytischen Identifizierung der Verunreinigungen eines halbsynthetischen Penicillins die Überprüfung der Reinheit auf chromatographischem Wege eine Rolle. DOYLE und Mitarbeiter (2, 3) geben ein papierchromatographisches Verfahren an, in dem die Penicilline durch Auflegen der Papierstreifen auf eine mit *Bacillus subtilis* beimpfte Agarplatte durch Bildung eines Hemmhofes sichtbar gemacht werden. Sie fanden auch bei unreinen Penicillinen jeweils nur eine mikrobiologisch wirksame Verbindung, deren R_f -Wert sich von den R_f -Werten der 6-APS unterschied. Über die anderen Verunreinigungen wurden mit dieser Methode selbstverständlich keine Aussagen gemacht. NUSSBAUMER (28) sowie FISCHER und LAUTNER (29) verwendeten die Dünnschichtchromatographie zur Auftrennung der Penicilline von der 6-APS und Spaltprodukten.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein dünnschichtchromatographisches Verfahren herangezogen. Das hierbei verwendete Laufmittelgemisch, das von EHRHARD und CRAMER (30) zur Auftrennung von Peptiden und Carbobenzoxyaminosäuren entwickelt wurde, eignet sich auch zur Abtrennung der Cbo-Dipeptidpenicilline von der 6-APS, den Abbauprodukten des Penicillins und nicht umgesetztem Cbo-Dipeptid. In Abb. 1 ist das Schema eines bei der Chromatographie von 6-(Cbo-glycylglycylamido)-penicillansäure erhaltenen Chromatogramms angegeben.

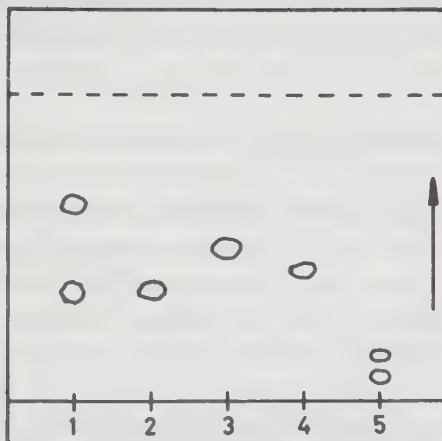


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Dünnschichtchromatogramms. 1: Cbo-glycylglycyl-Penicillin; 2: Zersetzungsprodukte von 1; 3: Cbo-glycylglycin; 4: 6-APS; 5: Zersetzungsprodukte von 4.

Da die Penicillinspaltprodukte ebenfalls Schwefel enthalten und das als Nachweisreagenz benutzte Jodazid entfärben, wurde zu ihrer Identifizierung eine Probe der verwendeten Penicillinlösung jeweils mit einem Tropfen Natronlauge vollständig hydrolysiert und als Vergleich aufgetragen. Das als Ausgangsprodukt verwendete Cbo-Dipeptid wurde anschließend mit einer Chromschwefelsäurelösung (30) besprüht und erschien nach Erhitzen der Platte als brauner Fleck. Es lag gut erkennbar zwischen dem Cbo-Dipeptidpenicillin und dessen Zersetzungsprodukten. Die anderen in dieser Arbeit beschriebenen Cbo-Dipeptidpenicilline zeigten bei größeren R_f -Werten ebenfalls eine ähnliche Auftrennung.

2. Reinigungsversuche an Peptidpenicillinen.

Die weiteren Isolierungsversuche der Peptidpenicilline wurden auf zwei Wegen durchgeführt:

1. Abspaltung des Cbo-Restes vom nicht gereinigten Dipeptidpenicillin und anschließende Reinigung,
2. Reinigung des am endständigen Stickstoff geschützten Dipeptidpenicillins mit anschließender Abspaltung.

a) Abspaltung der Schutzgruppe mit anschließender Reinigung.

Das einzige chemisch rein beschriebene Penicillin, das aus einer Aminosäure und 6-APS hergestellt wurde, ist das Ampicillin (4). Es wurde nach Abspaltung der Cbo-Schutzgruppe gereinigt. Es sollte deshalb dieses Verfahren zunächst auf die Dipeptid-Penicilline übertragen werden.

Die in der Literatur beschriebenen Penicilline mit einem Aminosäurerest in der Seitenkette wurden vielfach durch katalytische Hydrierung der entsprechenden Cbo-Verbindung erhalten (2, 3, 32, 33). Es entstehen dabei als nicht störende Nebenprodukte Toluol und Kohlendioxid. Durch den im Penicillinmolekül anwesenden Sulfid-Schwefel werden jedoch die Edelmetallkatalysatoren sehr leicht vergiftet. Deshalb wurden extrem große Katalysatormengen verwendet, so z.B. die vierfache Menge eines 30%igen Palladium-Bariumkarbonat-Katalysators. Da dieses Verfahren sehr kostspielig und aufwendig ist, wurde von uns nach anderen Katalysatoren gesucht.

Eine Arbeit von EKSTROM und Mitarb. (34), in der die Darstellung von Ampicillin aus α -Azidobenzylpenicillin durch katalytische Hydrierung mit Raney-Nickel beschrieben wird, gab den Anlaß für eine Untersuchung über die Verwendbarkeit von Raney-Nickel bei der Abspaltung der Cbo-Gruppe. Schon im Jahre 1944 hatten RUGGLI und DAHN diesen Katalysator zur Abspaltung der Cbo-Gruppe von einem Amin benutzt (69). Für die Anwendung bei Peptiden gibt es jedoch bis jetzt keine Beispiele.

Es wurde deshalb zunächst an einfachen Peptiden die Eignung

des Raney-Nickel untersucht. Als Modell für eine einfache Dipeptid-Säure diente uns Cbo-L-alanylglycin, das, in wässrigem Methanol gelöst, nach einstündigem Hydrieren im Wasserstoff-Durchfluß in 80%iger Ausbeute als freies Peptid isoliert werden konnte. Die zunächst durch das Nickel verunreinigten Kristalle wurden durch Umkristallisieren aus 80%igem Äthanol in guter Reinheit erhalten. Bei der Abspaltung der Cbo-Gruppe von der Dipeptidsäure Cbo-glycyl-L-phenylalanin lag die Ausbeute bei 50 % nach zweistündigem Hydrieren. In beiden Fällen wurde nur wenig der nicht umgesetzten Cbo-Verbindung zurückgewonnen.

Wesentlich ungünstiger lagen die Verhältnisse bei eingesetzten Cbo-Peptidestern. Während auch hier die Abspaltung in wässrigem Methanol mit Raney-Nickel durchgeführt werden konnte, wie durch die Bildung von Toluol und Kohlendioxid als Nebenprodukt der Hydrierung, sowie durch möglichst quantitatives Aufarbeiten der nicht umgesetzten Cbo-Verbindungen angenommen werden konnte, zeigten sich bei der Reinigung der freien Peptidester Schwierigkeiten. So bildeten sich aus freiem Glycyl-glycinäthylester in alkalischer Lösung Reaktionsprodukte - vermutlich Diketopiperazine - die eine Reinigung des Rohproduktes über das Hydrochlorid verhinderten. Auch der Tripeptidester Diglycylglycinäthylester kristallisierte wegen seines hydrophilen Charakters weder aus wässriger Lösung aus, noch ließ er sich alkalisch in Äther extrahieren.

Die Anwendbarkeit von Raney-Nickel bei Dipeptidpenicillinen wurde nun zunächst an Cbo-Ampicillin erprobt. Nach einstündigem Hydrieren einer wässrigen Lösung des Kaliumsalzes an Raney-Nickel im Durchfluß kristallisierte das Ampicillin beim Einengen der wässrigen Lösung bei pH 4,6 in Form feiner Nadeln aus. Die Ausbeute betrug 60 % bei 75%iger Reinheit; nach einmaligem Umkristallisieren verblieben nur noch 20 % mit 93%iger Reinheit. Es wurden noch 10 % Ausgangsverbindung zurückgewonnen.

Bei der Übertragung der Methode auf die Cbo-Dipeptidpeni-

cilline, die in der Seitenkette Glycin und Phenylalanin enthielten, erfolgte ebenfalls die Abspaltung der Schutzgruppe, wie aus der Entstehung von Toluol und Kohlendioxid, das über Barytwasser aufgefangen wurde, zu erkennen war. Ebenfalls wurden nur 10-20 % der Ausgangsverbindung zurückgewonnen. Es gelang jedoch nicht, die freien Peptidpenicilline durch Einengen der wässrigen Phase am isoelektrischen Punkt kristallin zu erhalten.

DOYLE und Mitarbeiter (2) hatten bei der Herstellung der Penicilline mit Glycin oder Phenylalanin in der Seitenkette auf eine Isolierung der Produkte verzichtet. Es lag nun der Verdacht nahe, daß diese Penicilline durch Einführung des Glycin-Moleküls hydrophiler würden. Ähnliche Eigenschaften kann man z.B. in der Reihe Cbo-glycinäthylester, Cbo-glycylglycinäthylester und Cbo-diglycylglycinäthylester beobachten, in der die Wasserlöslichkeit stark zunimmt.

Zur Bestätigung dieser These wurde ein Penicillin aus Cbo-glycin und Ampicillin hergestellt. Auch in diesem Fall zeigte die entstandene 6[D- α -(Glycylamino)-phenylacetamido]-penicillansäure stärker hydrophile Eigenschaften als das Ampicillin und ließ sich nicht aus der wässrigen Lösung auskristallisieren. Dieses Penicillin ist gerade in jüngster Zeit in einem Patent (64) beschrieben worden, allerdings ebenfalls nicht als reine, kristalline Verbindung.

In einem weiteren Versuch wurde die 6-(L-Phenylalanyl-amido)-penicillansäure hergestellt, um festzustellen, welchen Einfluß das Phenylalanin in der Seitenkette eines Peptidpenicillins auf dessen Wasserlöslichkeit ausübt. Auch dieses Penicillin konnte nicht aus wässriger Lösung kristallin isoliert werden.

Vergleicht man die Wasserlöslichkeit der eingesetzten Aminosäuren Glycin (25 %), L-Phenylalanin (3 %) und D- α -Phenylglycin (0,5 %), so ist gut zu erkennen, daß die Löslichkeit der synthetisierten Penicilline mit Glycin und Phenylalanin

in der Seitenkette die Wasserlöslichkeit des Ampicillins (2,8 % bei pH 4) um ein Vielfaches übersteigen wird. Diese Ergebnisse erklären nun, weshalb es bei den synthetisierten Dipeptidpenicillinen nicht gelang, durch Umkristallisieren aus Wasser reine Verbindungen zu erhalten.

Auch Zusätze von anorganischen Salzen, wie sie zum Aussalzen von organischen Verbindungen, z.B. bei der Isolierung von Aminosäuren, verwendet werden, bewirkten keine Kristallisation. Es konnten nur durch Eindampfen, Lyophilisieren oder Fällen mit Alkohol und Aceton amorphe Penicilline gewonnen werden, die durch Spaltprodukte und anorganische Salze verunreinigt waren.

Es wurde anschließend versucht, eine Abtrennung der anorganischen Salze zu erreichen. Wegen der Hydrolyseempfindlichkeit der Verbindungen konnten Ionenaustauscher nicht verwendet werden. Die Dialyse durch einen Cellophan-Dialyserschlauch führte wegen der geringen Molekülgröße der Penicilline ebenfalls nicht zum Ziel. Auch Gelfiltration mit Sephadex^R brachte nicht die gewünschte Trennung; die penicillinhaltigen Fraktionen zeigten auf der DC-Platte zwei Substanzflecken und außerdem im Tüpfel-Test ein Maximum an Sulfat- bzw. Chlorid-Ionen. DENNEN (36) trennte an Sephadex^R G 10 Penicillin-G von 6-APS und einem Dimeren der 6-APS. Die von ihm isolierten Verbindungen besitzen jedoch Molekulargewichte sehr unterschiedlicher Größe, während die Molekulargewichte der von uns eingesetzten Penicilline sich nur sehr wenig von denen der durch Hydrolyse entstandenen entsprechenden Penicillosäuren unterscheiden.

Da eine Reinigung der freien Dipeptidpenicilline nicht möglich war, sollte versucht werden, reine Cbo-Dipeptidpenicilline zu isolieren, um an ihnen die vorgesehenen mikrobiologischen Untersuchungen vorzunehmen.

b) Reinigung der Cbo-Dipeptidpenicilline.

Es wurden folgende Verfahren herangezogen:

Kristallisationsversuche aus verschiedenen Lösungsmittelgemischen und Fällungsverfahren.

Bildung schwerlöslicher Salze.

Chromatographische Verfahren.

Das Umkristallisieren eines Cbo-Peptids erfolgt in der Regel entweder aus wässrigem Alkohol oder aus Essigester, dessen Lösungseigenschaften durch Zusätze von Äther oder Petroläther herabgesetzt werden. Die Kristallisationsfähigkeit der Peptide ist dabei recht unterschiedlich und erfolgt oft erst nach längerer Zeit.

Es wurde nun zunächst versucht, die in ihren Lösungseigenschaften den Cbo-Dipeptiden ähnlichen Cbo-Dipeptidpenicilline als freie Säure aus Alkoholen bzw. wässrigen Alkoholen umzukristallisieren. Die dabei ausfallenden Verbindungen waren entweder ölig oder amorph, auch bei Verwendung von Aktivkohle oder Aluminiumoxid. Die Alkalisalze dieser Penicilline lösten sich in den höheren Alkoholen naturgemäß schlechter. So wurde z.B. am Kaliumsalz des Cbo-glycylglycyl-Penicillins von 52%iger Reinheit der Reinigungseffekt in Propanol untersucht. Das in der Kälte ausgefallene Produkt hatte nur noch einen geringen Reinheitsgrad (15 %), während sich aus dem Filtrat das Penicillin in etwa 50%iger Reinheit durch Zugabe von Äther oder durch Einengen der Lösung ausfällen ließ. Eine Steigerung der Reinheit wurde also nicht erreicht.

Ein ähnlicher Effekt trat bei Verwendung organischer Lösungsmittel auf, bei denen keine Aufspaltung des β -Lactamringes durch Solvolyse eintreten konnte. So wurde z.B. aus einer Lösung von Cbo-glycyl-Penicillin mit 86%iger Reinheit in Aceton durch Fällen mit absolutem Äther zunächst eine weniger reine Fraktion von 34%iger Reinheit und aus dem Filtrat mit Petroläther eine Fraktion mit 75%iger Reinheit gefällt.

Versuche, die Cbo-Dipeptidpenicilline als wasserunlösliche Salze eines Amins, z.B. des von SZABO und Mitarbeitern (37) vorgeschlagenen N,N'-Dibenzyläthylendiamins, zu kristallisieren, führten nicht zum Erfolg. Beim Umkristallisieren dieser Verbindungen zeigte es sich, daß relativ reine Substanzen, z.B. das Cbo-glycyl-Penicillin (86 %) auch relativ reine Salze (88 % Reinheit) lieferten; während bei unreinen Dipeptidpenicillinen unter großen Verlusten meist nur ölige Produkte erhalten wurden.

Neben der Säulenchromatographie an Sephadex^R G 10, die aus den oben erwähnten Gründen keine Auftrennung von den Spaltprodukten brachte, wurde die präparative Dünnschichtchromatographie auf ihre Eignung als Reinigungsverfahren untersucht. Hierbei konnte jedoch, im Gegensatz zu den Untersuchungen im analytischen Maßstab, keine vollständige Auftrennung des Penicillins von den Spaltprodukten erhalten werden. Wie aus den anschließend beschriebenen Stabilitätsuntersuchungen zu erkennen ist, bilden sich während der längeren Laufzeit zusätzlich Spaltprodukte.

IV. STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN

=====

1. Stabilitätsuntersuchungen unter Synthesebedingungen.

Wie bereits im allgemeinen Teil ausgeführt wurde, zeichnen sich die Penicilline durch eine sehr große Instabilität gegenüber den verschiedensten Einflüssen aus. Dies mußte sich auch nachteilig hinsichtlich des Anfalls von Spaltprodukten bei den Synthesen bemerkbar machen. Es sollte daher der Einfluß einiger Reaktionsbedingungen auf die Stabilität von einigen Penicillinen untersucht werden. Hierdurch sollte erreicht werden, daß im Verlauf der Synthesen Bedingungen ausgeschlossen werden können, die sich sehr ungünstig auf die Stabilität der Penicilline auswirken.

a) Reaktionszeit während der Kupplung.

Bei der Herstellung der Penicilline nach dem Anhydridverfahren kann nur während der Aminolyse des aus der Cbo-Aminosäure oder dem Cbo-Dipeptid und Chlorameisensäureäthylester hergestellten gemischten Anhydrids mit 6-APS eine Zersetzung des Penicillins eintreten. Es wurde deshalb die Dauer der Aminolyse variiert und ihr Einfluß auf die Bildung von Spaltprodukten am Beispiel der Synthese von 6-(Cbo-glycyl-amido)-penicillansäure untersucht. In Tabelle 1 sind die Ausbeuten und die Reinheit der isolierten Verbindungen aufgeführt.

Tabelle 1

Reaktionszeit	Ausbeute	Reinheit
0 Min	57 %	86 %
30 "	63 %	79 %
60 "	67 %	81 %
90 "	60 %	86 %

Es zeigt sich, daß bei längerer Reaktionszeit der Aminolyse keine nennenswerte Steigerung der Ausbeute zu erreichen ist und gleichzeitig keine Abnahme der Reinheit des Penicillins erfolgt. Daß es in allen Fällen zur Bildung von Penicillin-spaltprodukten kommt, wurde zusätzlich dünnschichtchromatographisch nachgewiesen.

b) Stabilität in Lösungsmitteln.

In einer weiteren Versuchsreihe sollte geklärt werden, welchen Einfluß die bei der Synthese und während der Aufarbeitung verwendeten Lösungsmittel auf die Zersetzung der 6-APS und der entstandenen Penicilline haben. Die Kontrolle des Reinheitsgrades erfolgte entweder nach der Hydroxylamin-Methode oder durch Verfolgung der spezifischen Drehung. Dieses von PECK und FOLKERS (21) bei der Alkoholyse von Penicillin G angegebene Verfahren eignet sich besonders für

kinetische Messungen in indifferenten Lösungsmitteln oder Puffern, bei denen die Hydroxylamin-Methode versagt. Eine quantitative Gehaltsbestimmung ist jedoch nur möglich, wenn die spezifische Drehung des reinen Penicillins und der entsprechenden Penicillosäure bekannt ist. In mehreren Versuchen wurden zur Kontrolle beide Methoden nebeneinander durchgeführt.

Es wurde nun die Beständigkeit des Triäthylammoniumsalzes der 6-Aminopenicillansäure in Chloroform (mit 2 Val Triäthylamin), in wässrigem Aceton (20 % Wasser mit 1 Val Triäthylamin) und in 0,01n Salzsäure gemessen. Die beiden erstgenannten Lösungsmittel wurden mehrfach bei der Penicillinsynthese herangezogen. In ihnen wurde nach 24 Stunden bei 20° keine Änderung des Drehwertes festgestellt, während in der Lösung von 6-APS in 0,01n Salzsäure schon innerhalb der ersten Stunden eine starke Abnahme der spezifischen Drehung auftrat. (Abb. 2) Eine Lösung von 6-(Cbo-glycylamido)-penicillansäure in Chloroform (mit 2 Val Triäthylamin) war ebenfalls über 24 Stunden stabil.

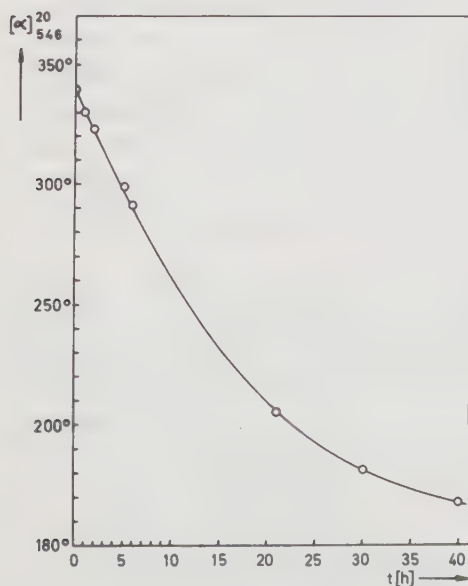


Abb. 2
Abnahme der spezifischen
Drehung von 6-APS in
0,01n Salzsäure

Aus diesen Untersuchungen geht nun hervor, daß während der Kupplung keine nennenswerte Hydrolyse des Lactamringes eintritt. Die Spaltprodukte mußten also erst bei der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes und bei der nachfolgenden Reinigung entstehen. Die Stabilität der Penicilline in den hierfür verwendeten Lösungsmitteln wurde in den folgenden Meßreihen untersucht.

2. Stabilität der Penicilline unter Reinigungsbedingungen.

a) in wässrigen Lösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert

Es war zu erwarten, daß in wässrigen Lösungen eine relativ schnelle Zersetzung der Cbo-Dipeptidpenicilline eintritt. Die Untersuchung wurde mit 6-(Cbo-glycylamido)-penicillansäure (57 % Reinheit) durchgeführt. Es wurden Lösungen in 0,1%iger Natriumbicarbonat-Lösung (pH 8,4), bidestilliertem Wasser (pH 7,0), Acetatpuffer (pH 4,6; Zusatz von 20 % Äthanol) und 0,01n Salzsäure (pH 2,0; Zusatz von 50 % Äthanol) hergestellt und der Reinheitsgrad innerhalb von 3 Tagen bei Raumtemperatur mit dem Hydroxylamin-Test bestimmt. Der graphischen Darstellung in Abb. 3 ist zu entnehmen, daß die Stabilität in der Reihenfolge neutral-schwach sauer-basisch-stark sauer abnimmt. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß in reinem Wasser im Laufe der Zeit durch die Hydrolyse eine pH-Verschiebung nach pH 5,6 auftrat.

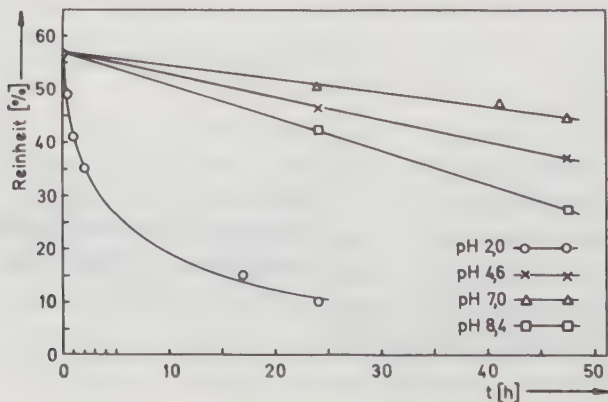


Abb. 3 Abhängigkeit der Stabilität von Cbo-glycyl-Penicillin vom pH-Wert

Ein analoges Verhalten zeigten die Kaliumsalze der Cbo-Dipeptidpenicilline Cbo-glycylglycyl-Penicillin (I, 73 % Reinheit) und Cbo-glycyl-DL-phenylalanyl-Penicillin (II, 50 % Reinheit) und Cbo-DL-phenylalanylglycyl-Penicillin (III, 75 % Reinheit).

In Tabelle 2 ist der Penicillingehalt nach 30 und 70 Std. bezogen auf die ursprüngliche Reinheit zu Beginn der Messung in Lösungen mit verschiedenen pH-Werten angegeben.

Tabelle 2

pH	Substanz	30 Std.	70 Std.
4,6	I	56 %	51 %
	II	72 %	52 %
	III	51 %	45 %
7,0	I	62 %	59 %
	II	63 %	63 %
	III	60 %	57 %
8,4	I	50 %	37 %
	II	54 %	44 %
	III	55 %	42 %

b) Stabilität in organischen Lösungsmitteln

Über die Stabilität der Penicilline in organischen Lösungsmitteln wurde nur in wenigen Arbeiten berichtet (21, 22). Eingehend wurde von PECK und FOLKERS (21) die Alkoholyse am Penicillin G untersucht und folgende Gesetzmäßigkeiten gefunden:

- 1) Die Alkoholyse wird durch Alkalisalze beschleunigt; Penicillin G-Natrium zersetzt sich schneller als die freie Säure.
- 2) Absoluter Alkohol begünstigt die Alkoholyse.
- 3) Temperatursteigerung begünstigt die Alkoholyse.

- 4) Methanol reagiert schneller als Äthanol.
- 5) Die Alkoholyse verläuft bei unreinen Penicillinen schneller.

Diese Angaben wurden durch Abnahme der spezifischen Drehung und teilweise durch Abnahme der mikrobiologischen Aktivität in Zeitabhängigkeit belegt.

Da Alkohole bei der Reinigung von Peptiden als Lösungsmittel vielfach verwendet werden, sollte geprüft werden, welche Rolle die Alkoholyse bei einigen Peptidpenicillinen spielt. Es wurde die Stabilität von Ampicillin-Na und Cbo-glycyl-Ampicillin in verschiedenen Alkoholen untersucht und gleichzeitig die Änderung der spezifischen Drehung registriert. Das Natriumsalz des Ampicillins wurde wegen seiner besseren Löslichkeit verwendet. In Abb. 4 ist die Abnahme der Reinheit in Zeitabhängigkeit aufgetragen.

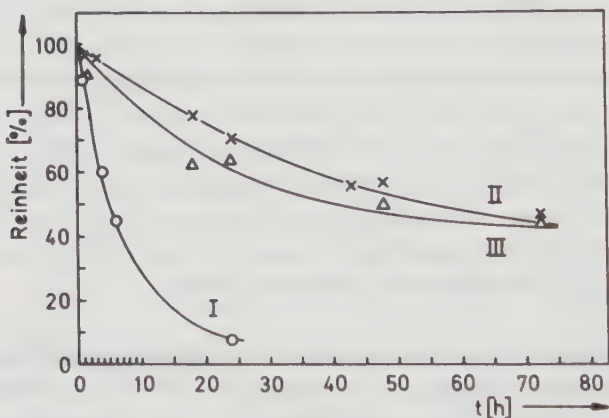


Abb. 4 Abnahme der Reinheit von Ampicillin-Na in Alkoholen
I in Methanol ($c=0,15$); II in Äthanol ($c=0,13$);
III in Propanol ($c=0,13$)

Die Frage, ob bei den Cbo-Dipeptidpenicillinen auch Unterschiede zwischen der Beständigkeit der Alkalisalze und der freien Säuren bestehen, wurde am Cbo-glycyl-Ampicillin (60 % Reinheit) und dessen Kaliumsalz (40 % Reinheit) untersucht. In Abb. 5 ist die Änderung des Reinheitsgrades dieser Penicilline in alkoholischen Lösungen innerhalb von 5 Tagen graphisch dargestellt.

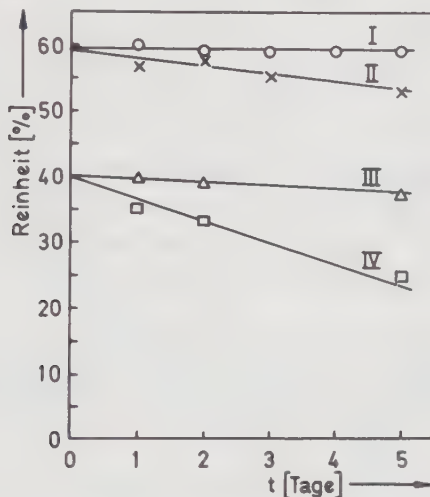


Abb. 5 Änderung des Reinheitsgrades von Cbo-glycyl-Ampicillin in Alkoholen ($c=0,2$). I in Äthanol; II in Propanol; III K-Salz in Äthanol; IV K-Salz in Propanol.

Ein Vergleich der Änderung der spezifischen Drehung eines Penicillins mit der Reinheit wurde ebenfalls an Cbo-glycyl-Ampicillin durchgeführt. In Tabelle 3 sind für eine methanolische Lösung des Penicillins die parallel bestimmten Drehwerte und Reinheitsgrade aufgeführt.

Tabelle 3

Stunden	$[\alpha]_D^{25}$	Reinheit
0	100°	59 %
20	90°	50 %
65	80°	45 %
92	70°	41 %
120	62°	32 %

An der gleichen Verbindung wurde die Beständigkeit beim Erwärmen auf eine konstante Temperatur von 60° in verschiedenen Lösungsmitteln (Äthanol, Propanol, Methylisobutylketon, Aceton und Essigester) mittels der spezifischen Drehung untersucht; bei den alkoholischen Lösungen erfolgte gleichzeitig eine Kontrolle durch den Hydroxylamin-Test. Reinheitsgrad und Drehwert blieben über 2 Stunden konstant.

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen machen:

- 1) Ampicillin-Na zeigt in Methanol eine starke Abnahme der Aktivität, die Halbwertszeit beträgt 5Std. In Äthanol und Propanol dagegen beträgt sie 3 Tage.
- 2) Bei dem Peptidpenicillin Cbo-glycyl-Ampicillin tritt eine nennenswerte Alkoholyse der freien Säure erst nach mehreren Tagen ein, während das Kalium-Salz wesentlich solvolyseempfindlicher ist.
- 3) Cbo-glycyl-Ampicillin ist auch bei zweistündigem Erwärmen auf 60° in Äthanol, Propanol, Aceton, Methylisobutylketon und Essigester beständig.

Es ergab sich nun die Frage, welchen Einfluß organische Lösungsmittel in Verbindung mit anorganischen Säuren auf die Zersetzung der Penicilline haben. Solche Bedingungen liegen ja bei der Extraktion des Penicillins aus einer wässrigen sauren Lösung in ein organisches Lösungsmittel, wie Methylisobutylketon oder Essigester, vor.

Die Untersuchungen wurden mit 6-(Cbo-glycylamido)-penicillansäure (57 % Reinheit) durchgeführt. Gemessen wurde die Änderung der spezifischen Drehung bei 21°. Da sich wegen der

sehr schlechten Mischbarkeit von Methylisobutylketon mit Salzsäure keine Lösung des Penicillins in der organischen Phase bei pH 2 herstellen ließ, wurde zunächst eine Lösung des Penicillins in 50%igem Äthanol, das mit Salzsäure auf pH 2 angesäuert worden war, verwendet. Ferner wurde, um eine mögliche Alkoholyse auszuschließen, die gleiche Untersuchung in Dioxan, das mit einigen Tropfen Salzsäure auf pH 2 angesäuert worden war, und in Methylisobutylketon mit Dioxan (30 %) als Lösungsvermittler bei pH 2 durchgeführt.

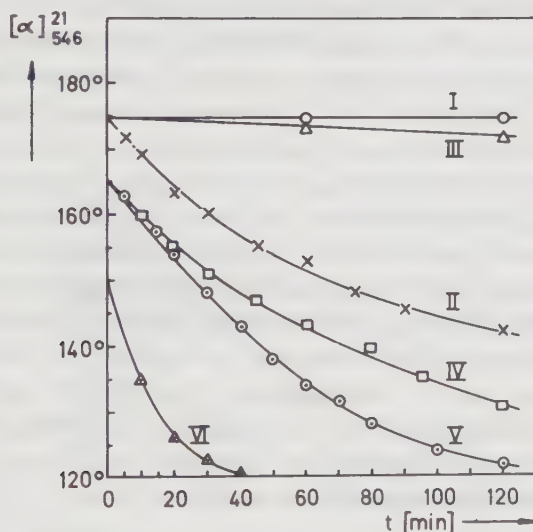


Abb. 6 Abnahme der spezifischen Drehung von Cbo-glycyl-Penicillin in Lösungsmitteln

I: Dioxan, 21° (c=0,9)

II: " , 21° (c=1,0), pH 2

III: 50%igem Äthanol, 21° (c=0,6)

IV: " " , 50° (c=0,8)

V: " " , 21° (c=0,6), pH 2

VI: Methylisobutylketon/Dioxan (7:3), 21°, pH 2

In der Abb. 6 ist die Änderung der spezifischen Drehung innerhalb von 2 Stunden graphisch dargestellt. Als Vergleich sind die Drehwerte des Penicillins in 50%igem Äthanol und Dioxan ohne Zusatz von Salzsäure sowie die Abnahme der spezifischen Drehung in 50%igem Äthanol bei 50° dargestellt.

Aus der graphischen Darstellung ist zu erkennen, daß die Zersetzung der Penicilline bei pH 2 sehr schnell verläuft. Nach 2 Stunden war z.B. der Penicillingehalt der sauren alkoholischen Lösung auf 11 % abgesunken, wie durch eine Bestimmung mit dem Hydroxylamin-Test gemessen wurde.

In einer zweiten Versuchsanordnung wurde das Penicillin in Methylisobutylketon gelöst, mit Salzsäure (pH 2) mehrmals 5Min. lang geschüttelt und jeweils die spezifische Drehung in der organischen Phase bestimmt. Dabei zeigte es sich, daß der Drehwert erniedrigt wurde und schon nach 5Min. nahezu konstant blieb. Der gleiche Effekt trat bei Verwendung von Wasser anstelle der Salzsäure auf. Im vergleichsweise ange-setzten Dünnschichtchromatogramm ließen sich keine Änderungen der Zusammensetzung der Lösungen feststellen; es traten stets 2 Flecke in gleichbleibender Intensität auf. Durch Zugabe von festem Natriumchlorid in das Zweiphasensystem konnte geklärt werden, daß die Abnahme des Drehwertes durch eine geringe Wasserlöslichkeit des Penicillins und die damit verbundene Konzentrationsabnahme im Methylisobutylketon verursacht wurde. Es zeigte sich nämlich, daß sowohl im System Methylisobutylketon/Wasser als auch im System Methylisobutylketon/Salzsäure nach Zugabe von Natriumchlorid der Drehwert wieder den ursprünglichen Wert erreichte.

Mit diesen Untersuchungen läßt sich also nicht klären, welchen Grad die Zersetzung des Penicillins während des Extrahierens aus der sauren wässrigen Phase in Methylisobutylketon erreicht, da es schwer zu entscheiden ist, ob der tatsächlich vorliegende Zustand der öligen Emulsion des Penicillins im System Methylisobutylketon/Salzsäure besser durch die erste Versuchsanordnung (in Lösung bei pH 2) oder durch die zweite Versuchsanordnung (im Zweiphasensystem) wiedergegeben wird. Da jedoch beim Aufarbeiten der Penicillinansätze geringe Mengen Alkohol zum raschen Aufheben einer entstandenen Emulsion hinzugesetzt wurden, erscheint die erste Versuchsanordnung den Tatsachen eher zu entsprechen.

Wesentlich erschien es auch, die Stabilität der Peptid-Penicilline in dem Lösungsmittelgemisch Butanol-Eisessig-Wasser-Pyridin (30:6:24:20) zu untersuchen, da dieses zur präparativen Dünnschichtchromatographie verwendet wurde; hierbei betrugen die Laufzeiten etwa 4 Stunden. Der pH-Wert lag bei 6.

In Abb. 7 ist die Änderung der spezifischen Drehung von Cbo-glycyl-Ampicillin und Cbo-glycylglycyl-Penicillin innerhalb von 24 Stunden graphisch dargestellt. Es zeigt sich eine Abnahme des Drehwertes, die nicht so stark ist, wie in Lösungen bei pH 2, jedoch wesentlich stärker als in wässrigem Äthanol.

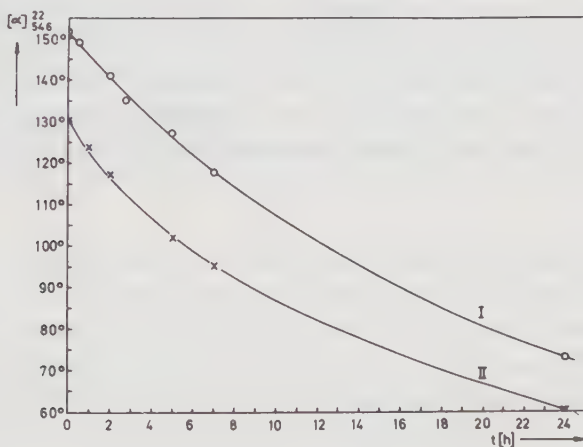


Abb. 7 Abnahme der spezifischen Drehung von Cbo-glycylglycyl-Penicillin (I) und Cbo-glycyl-Ampicillin (II) in dem Lösungsmittelgemisch Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin (30:6:24:20)

3. Stabilitätsuntersuchung in fester Form.

Eine recht häufig beobachtete Eigenschaft der Penicilline bei ihrer Isolierung ist ihr hygroskopisches Verhalten. Es ist die Folge ihres amorphen Zustandes als erstarrtes Öl, das sich flockig beim Ausfällen des Alkalisalzes aus Aceton oder Methylisobutylketon mit Äther oder Petroläther bildet. Je besser die Substanz mit dem Fällungsmittel gewaschen und je vollständiger die Luftfeuchtigkeit beim Absaugen des Niederschlages ausgeschlossen wird, umso unempfindlicher wird sie nach dem Trocknen über Phosphorpentoxid gegen Luftfeuchtigkeit.

Eine schnelle Aussage über die Feuchtigkeitsaufnahme einer Substanz läßt sich durch Aufnahme der Sorptionsisotherme machen. Hierzu wird die Verbindung unter laufender Gewichtskontrolle bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchtigkeiten so lange gelagert, bis keine Feuchtigkeitsaufnahme mehr festzustellen ist. Die erhaltenen Werte ergeben bei graphischer Auswertung eine Kurve, die als Sorptionsisotherme bezeichnet wird (68).

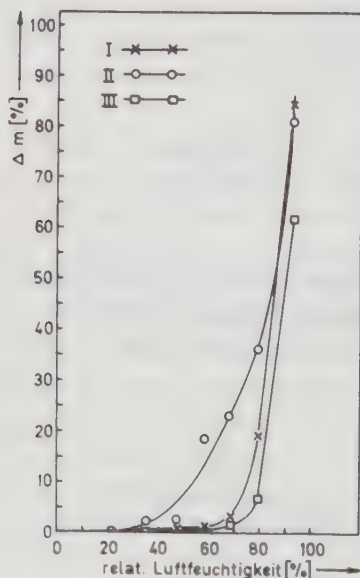


Abb. 8

Sorptionsisotherme bei 20°

I: Penicillin G-Na

II: Ampicillin-Na

III: Cbo-glycyl-Penicillin-K

Aus Abb. 8 ist zu ersehen, daß die untersuchten Penicilline unterschiedliche Empfindlichkeit gegen Feuchtigkeit aufweisen. Während das Natriumsalz des Ampicillins bereits von einer relativen Feuchte von etwa 20 % an Wasser aus der Luft aufnehmen kann, ist dies beim Penicillin G-Na und Cbo-glycyl-Penicillin-K erst von einer relativen Feuchte von etwa 40 % an der Fall. Es war anzunehmen, daß in einer entsprechenden Weise die Stabilität der beiden letzten Verbindungen bei der Lagerung an der Luft größer ist als die des Ampicillin-Na. Dies ist aus Tab. 4 zu ersehen. Der Reinheitsgrad der Penicilline zu Beginn der Untersuchung ist in Klammern angegeben.

Tabelle 4

Zeit [Tage]	14	40		
rel. Luftfeuchtigkeit [%]	90	79	58	47
Penicillin G-Na (98 %)	52 %	67 %	91 %	93 %
Ampicillin-Na (99 %)	10 %	7 %	26 %	71 %
Cbo-glycyl-Penicillin-K (90 %)	47 %	63 %	81 %	89 %

Nach 14tägiger Lagerung bei einer relativen Feuchte von 90 % betrug die Reinheit des Ampicillin -Na nur noch 10 %, während die entsprechenden Werte von Penicillin G-Na und Cbo-glycyl-Penicillin-K bei 52 % bzw. 47 % lagen. Die Tabelle führt weiter die entsprechenden Reinheitswerte nach 40tägiger Lagerung bei unterschiedlichen Feuchten an.

4. Diskussion der Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen.

Für die Synthese und Reindarstellung von Cbo-Dipeptid-Penicillinen läßt sich aufgrund der Stabilitätsuntersuchungen folgende Schlußfolgerung ziehen:

Die auftretenden Verunreinigungen durch Spaltprodukte der Penicilline entstehen nur in geringen Mengen während der Kupplung der Cbo-Dipeptide mit der 6-Aminopenicillansäure. Dagegen erfolgt bei der Isolierung der Penicilline während des Extrahierens in indifferente Lösungsmittel bei pH 2 eine schnelle Hydrolyse, wenn die organische Phase durch hydrophile Lösungsvermittler wie z.B. Äthanol auf pH 2 gebracht wird. Die Hydrolysegeschwindigkeit der Penicillinsuspension in der wässrigen Phase bei pH 2 läßt sich jedoch nicht bestimmen. Beim Extrahieren in Bicarbonat-Lösung ist die Hydrolysegeschwindigkeit bedeutend langsamer, und während des Trocknens der Penicilline in indifferenten Lösungsmitteln mit Natriumsulfat tritt innerhalb von 30 Minuten keine Verminderung der Reinheit auf.

Da die Hydrolyseempfindlichkeit der Penicilline in saurem Medium allgemein bekannt war, wurde bei den in dieser Arbeit beschriebenen Synthesen stets darauf geachtet, die Penicilline so schnell wie möglich aus der sauren wässrigen Phase in das organische Lösungsmittel zu extrahieren. Es hatten sich jedoch stets Hydrolyseprodukte gebildet, und es muß angenommen werden, daß bei der Herstellung halbsynthetischer Penicilline eine Hydrolyse nicht ausgeschlossen werden kann.

Die vollständige Reinigung der Penicilline ist nur durch Umkristallisieren möglich, da beim Umfällen z.B. aus Aceton mit Äther oder Petroläther nur unreine amorphe Produkte entstehen. Dabei müssen Alkohole als Lösungsmittel vermieden werden. Es ist ferner wichtig, daß in dem verwendeten Lösungsmittel die reinen Penicilline schnell auskristallisieren, um eine Zersetzung in Lösung zu vermeiden.

Die Haltbarkeit getrockneter Penicilline ist nur bei einer relativen Luftfeuchtigkeit unter 40 % für längere Zeit gewährleistet.

V. ZUSAMMENFASSUNG

=====

In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese einiger Dipeptidpenicilline nach dem Anhydridverfahren beschrieben. Als Aminosäurekomponente wurden hierzu Glycin, DL-, D- und L-Phenylalanin und D- α -Phenylglycin verwendet. Die Verbindungen fallen in unterschiedlichen Reinheitsgraden an. Trotz Anwendung verschiedenartiger Reinigungsverfahren gelang es nicht, zu kristallinen Stoffen zu kommen.

Zur Abspaltung der Carbobenzoxy-Schutzgruppe wird das Verfahren der katalytischen Hydrierung an Raney-Nickel auf seine Anwendbarkeit in der Penicillin-Chemie untersucht.

Stabilitätsuntersuchungen befaßten sich mit dem Verhalten von Penicillinen unter verschiedenen Bedingungen der Synthese. Hierbei wurde für kinetische Messungen in organischen Lösungsmitteln besonders die Änderung der spezifischen Drehung der Penicilline als Bestimmungsmethode für geeignet gefunden.

VI. EXPERIMENTELLER TEIL =====

1. Allgemeine Angaben

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit einem LINDSTRÖM-Block. Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Die spezifische Drehung (für die Natrium-D-Linie) der Peptide wurde am Kreispolarimeter $0,01^{\circ}$ (Carl Zeiss) gemessen; die kinetischen Messungen wurden am lichtelektrischem Präzisionspolarimeter $0,005^{\circ}$ (Carl Zeiss) mit der Quecksilberlampe (Filter 546 nm) durchgeführt.

Die Gehaltsbestimmungen der Penicilline nach der Hydroxylamin-Methode wurden an einem Spektralphotometer (Carl Zeiss, Modell PMQII) durchgeführt.

2. Cbo-Aminosäuren

Benzyloxycarbonylglycin (I)

Die Darstellung erfolgt nach BERGMANN und ZERVAS (38) aus 30,0g (0,4 Mol) Glycin und 68,0g (0,4 Mol) Chlorameisensäurebenzylester in alkalischer Lösung bei pH 8-9. Es wird aus Chloroform umkristallisiert.

Ausbeute: 67,1g (80 % der Theorie)

Schmp. $121-123^{\circ}$ Lit. (38) 120° (korr.)

Benzyloxycarbonyl-DL-phenylalanin (II)

Die Darstellung erfolgt analog zu I aus 16,5g (0,1 Mol) DL-Phenylalanin und 17,0g (0,1 Mol) Chlorameisensäurebenzylester. Es wird aus Tetrachlorkohlenstoff umkristallisiert.

Ausbeute: 17,0g (60 % der Theorie)

Schmp. $103-104^{\circ}$ Lit. (39) 103°

Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanin (IIa)

Die Darstellung erfolgt analog zu I aus 16,5g (0,1 Mol) L-Phenylalanin und 17,0g (0,1 Mol) Chlorameisensäurebenzylester. Das über Kaliumhydroxid getrocknete Rohprodukt kristallisiert sehr schlecht aus wässrigem Methanol aus und wird gleich weiterverarbeitet.

Ausbeute: 26,2g (91 % der Theorie)

Schmp. 121-124° Lit. (40) 122-124°

Benzyloxycarbonyl-D-phenylalanin (IIb)

Die Darstellung erfolgt analog zu I aus 9,9g (60m Mol) D-Phenylalanin und 10,2g (60m Mol) Chlorameisensäurebenzylester. Es wird auf Ton abgepreßt und das aus wässrigem Methanol als Gallerte ausfallende Rohprodukt gleich weiterverarbeitet.

Ausbeute: 15,0g (88 % der Theorie)

Schmp. 126-128° Lit. (41) 132°

D- α -Benzyloxycarbonylamino- α -phenylelessigsäure (III)

Die Darstellung erfolgt analog zu I aus 11,0g (73m Mol) D- α -Phenylglycin und 12,5g (73m Mol) Chlorameisensäurebenzylester. Es wird aus 45%igem Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 12,0g (57 % der Theorie)

Schmp. 130° Lit. (4) 130-130,5°

$[\alpha]_D^{22}$ -118,0° (c=1; Äthanol) Lit. (4) $[\alpha]_D^{21}$ -119° (c=1; Äthanol)

Glycinäthylester-Hydrochlorid (IV)

Die Darstellung erfolgt nach CURTIUS (42) aus 300g (4 Mol) Glycin in Äthanol mit Salzsäuregas.

Ausbeute: 557g (89 % der Theorie)

Schmp. 143° Lit. (42) 143-144°

DL-Phenylalaninäthylester-Hydrochlorid (V)

Die Darstellung erfolgt nach BOISSONAS und Mitarb. (44) aus 36,3g (0,22 Mol) DL-Phenylalanin in Äthanol mit Thionylchlorid. Es wird zweimal aus Äthanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 35,0g (70 % der Theorie)

Schmp. 124-125° Lit. (43) 124-125°

L-Phenylalaninmethylester-Hydrochlorid (Va)

Die Darstellung erfolgt analog zu V aus 18,2g (0,11 Mol) L-Phenylalanin in abs. Methanol mit Thionylchlorid. Es wird aus Methanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 22,3g (93 % der Theorie)

Schmp. 160° Lit. (44) 160°

L-Phenylalaninäthylester-Hydrochlorid (Vb)

Die Darstellung erfolgt analog zu V aus 18,2g (0,11 Mol) L-Phenylalanin in abs. Äthanol mit Thionylchlorid. Es wird aus Äthanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 22g (87 % der Theorie)

Schmp. 152-154° Lit. (46) 155-156°

D-Phenylalaninäthylester-Hydrochlorid (Vc)

Die Darstellung erfolgt analog zu V aus 11,0g (66,6m Mol) D-Phenylalanin und Thionylchlorid in abs. Äthanol. Es wird aus Äthanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 12,0g (78 % der Theorie)

Schmp. 152-155° Lit. (41) 155°

D-Phenylalaninmethylester-Hydrochlorid (Vd)

Die Darstellung erfolgt analog zu V aus 11,0g (66,6m Mol) D-Phenylalanin und Thionylchlorid in abs. Methanol. Es wird aus Methanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 13,5g (94 % der Theorie)

Schmp. 159-160° Lit. (47) kein Schmp. angegeben

D- α -Phenylglycinäthylester-Hydrochlorid VI

Die Darstellung erfolgt analog zu V aus 7,6g (50m Mol) D- α -Phenylglycin und Thionylchlorid in abs. Äthanol. Es wird aus Äthanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 9,5g (88 % der Theorie)

Schmp. 199° Lit. (49) 203°

$[\alpha]_D^{22}$ -91,7° (c=1; Wasser) Lit. (48) $[\alpha]_D^{23}$ -88,95° (p=5,021; Wasser)

3. Cbo-Dipeptide

Benzyloxycarbonylglycylglycinäthylester (VII)

Zu einer Lösung von 10,5g (50 mMol) Cbo-glycin (I) und 14ml (0,1 Mol) Triäthylamin in 150ml Tetrahydrofuran werden bei -10° unter starkem Rühren 4,8ml (50 mMol) Chlorameisensäureäthylester gegeben. Nach 5Min. wird eine gekühlte Lösung von 7,0g (50 mMol) Glycinäthylester-Hydrochlorid (IV) in 10ml Wasser schnell dazugegeben. Es wird 30Min. bei -10° und dann ohne Kühlung bis zur Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wird das ölige Produkt in Essigester aufgenommen, mit 3%iger Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 1n Salzsäure und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt (10g) wird aus 100ml Tetrachlorkohlenstoff umkristallisiert.

Ausbeute: 7,4g (50 % der Theorie)

Schmp. $81-83^{\circ}$ Lit. (50) 82°

Benzyloxycarbonylglycylglycin (VIII)

a) durch Verseifen des Dipeptidesters VII

7,4g (50 mMol) Cbo-glycylglycinäthylester (VII) werden in 500ml Aceton gelöst, 53ml 1n Natronlauge eingetropft und mit einem Vibromischer 30Min. intensiv durchmischt. Die auftretende Trübung durch das Na-Salz wird durch Einspritzen von Wasser gelöst. Das Aceton wird dann im Vakuum abgezogen, die wässrige Lösung verdünnt, mehrmals mit Essigester ausgeschüttelt, dann unter Eis-Kühlung mit Salzsäure angesäuert und das Rohprodukt aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 5,3g (80 % der Theorie)

Schmp. $177-178^{\circ}$ Lit. (38) 178°

b) durch Anhydrid-Kupplung mit dem Glycin-Salz

Zu einer Lösung von 27,0g (0,13 Mol) Cbo-glycin (I) und 18,2ml (0,13 Mol) Triäthylamin in 150ml Aceton werden unter starkem Rühren bei -10° 12,3ml (0,13 Mol) Chlorameisensäureäthylester getropft und nach 5Min. eine gekühlte Lösung von 10,5g (0,14 Mol) Glycin und 5,6g Natriumhydroxid in 50ml Wasser rasch hinzugefügt. Es wird noch 30Min. in der Kälte und dann bis zur Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel

Aceton im Vakuum abgezogen, mehrmals mit Äther ausgeschüttelt, der Äther aus der wässrigen Phase durch Luftdurchleiten entfernt und langsam unter Rühren mit konz. Salzsäure angesäuert. Es wird aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 19g (55 % der Theorie)

Schmp. 176-178°

Benzyloxycarbonyl-DL-phenylalanylglycinäthylester (IX)

Die Darstellung erfolgt analog zu VII aus 11,4g (40 mMol) Cbo-DL-phenylalanin (II) und 11,2ml (80 mMol) Triäthylamin in Tetrahydrofuran mit 3,8ml (40 mMol) Chlorameisensäureäthylester und 7,0g (50 mMol) Glycinäthylester-Hydrochlorid (IV). Die Isolierung des Dipeptidesters erfolgt analog zu VII in Essigester. Die Lösung wird im Vakuum eingeeengt. Durch Zugabe von Äther und Petroläther zur heißen Lösung kristallisiert die Verbindung beim Abkühlen in feinen Nadeln aus. Es wird aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 9,5g (59 % der Theorie)

Schmp. 98-101° Lit. (51) 101-103°

Benzyloxycarbonyl-DL-phenylalanylglycin (X)

9,5g (25 mMol) des Dipeptidesters IX werden in 300ml Aceton gelöst und nach Zugabe von 27ml 1n Natronlauge bei Raumtemperatur 90 Min. kräftig gerührt, wobei durch Einspritzen von Wasser die auftretende Trübung geklärt wird. Das Aceton wird dann im Vakuum abgezogen, aus der alkalischen Lösung durch mehrmaliges Ausschütteln mit Essigester der nicht verseifte Ester (3g) entfernt, angesäuert, mit Essigester extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet, auf 50ml eingeeengt und durch Zugabe von Äther und Petroläther die Säure gefällt. Es wird aus Essigester/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 5,2g (55 % der Theorie)

Schmp. 157-158° Lit. (51) 157-158°

$C_{19}H_{20}N_2O_5$

MG. 356,4

Ber.: N=7,85 %

Gef.: N=7,88 %

Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanylglycinäthylester (XI)

Zu einer Lösung von 20,0g (70 mMol) Cbo-L-phenylalanin (IIa) und 9,8ml (70 mMol) Triäthylamin in 500ml Aceton werden unter Rühren bei -10° 6,7ml (70 mMol) Chlorameisensäure-äthylester getropft. Nach 5Min. wird dazu eine Lösung von freiem Glycinäthylester [hergestellt nach (61) aus 14g (0,1 Mol) Hydrochlorid IV und 1 Val Triäthylamin] in Aceton rasch hinzugefügt, 30Min. in der Kälte und 2Std. auf Raumtemperatur gerührt und analog zu VII aufgearbeitet. Nach dem Eindampfen im Vakuum bleibt ein Öl zurück, das durch längeres Erhitzen am Rückfluß in Äther kristallisiert. Es wird aus Essigester/Äther (1:1) umkristallisiert.
Ausbeute: 15,3g (55 % der Theorie)
Schmp. $107-109^{\circ}$ Lit. (40) $107-108,5^{\circ}$

Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanylglycin (XII)

Die Verseifung erfolgt analog zu X durch einstündiges kräftiges Durchmischen einer Lösung von 12,5g (32,5 mMol) Dipeptidester XI in 400ml Aceton und 35ml 1n Natronlauge mit dem Vibromischer. Es wird analog zu X aufgearbeitet. Das ölige Produkt wird beim Erhitzen am Rückfluß mit Äther fest und aus Essigester/Äther umkristallisiert.
Ausbeute: 8,2g (71 % der Theorie)
Schmp. $152-153^{\circ}$ Lit. (40) 154°

$[\alpha]_D^{23} -9,8^{\circ}$ (c=1,14; Eisessig) Lit. (63) $[\alpha]_D^{18} -9,8^{\circ}$
(c=1,5; Eisessig)

$C_{19}H_{20}N_2O_5$

MG. 356,4

Ber.: N=7,85 %

Gef.: N=7,93 %

Benzyloxycarbonyl-D-phenylalanylglycinäthylester (XIII)

Zu einer Lösung von 12g (42 mMol) Cbo-D-phenylalanin (IIb) und 5,9ml (42 mMol) Triäthylamin werden bei -10° unter kräftigem Rühren 4ml (42 mMol) Chlorameisensäureäthylester gegeben. Nach 5Min. wird eine gekühlte Lösung von 5,2g frischem destilliertem Glycinäthylester (freigesetzt aus dem Hydrochlorid IV nach FISCHER, Kp₁₅ 65°) in 20ml Aceton rasch hinzugefügt. Es wird noch 30Min. in der Kälte und weiter ohne Kühlung auf Raumtemperatur gerührt und in

üblicher Weise aufgearbeitet. Das Rohprodukt (10g) wird mit Äther/Petroläther am Rückfluß erhitzt und aus Alkohol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 8,5g (53 % der Theorie)

Schmp. 109-111° Lit. (53) 109-111°

Benzyloxycarbonyl-D-phenylalanylglycin (XIV)

8,5g (22 mMol) des Dipeptidesters XIII werden in 350ml Aceton unter einstündigem kräftigem Durchmischen mit dem Vibrator mit 24ml 1n Natronlauge verseift und analog zu X aufgearbeitet. Das z.T. ölige Rohprodukt (8g) wird in Äther unter Zugabe von Essigester heiß gelöst und das im Kühlschrank auskristallisierte Produkt mehrmals aus Essigester/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 4,5g (57 % der Theorie)

Schmp. 151-153° Lit. (53) 150-151°

$[\alpha]_D^{26} +9,3^\circ$ (c=1,5; Eisessig) Lit. (53) $[\alpha]_D^{25} +9,7^\circ$ (Eisessig)

$C_{19}H_{20}N_2O_5$

Ber.: N=7,85 %

Gef.: N=7,85 %

Benzyloxycarbonylglycyl-DL-phenylalaninäthylester (XV)

Die Darstellung erfolgt analog zu VII aus 12,0g (60 mMol) Cbo-glycin (I) in 300ml Aceton und 16,8ml (2 Val) Triäthylamin und 5,7ml (60 mMol) Chlorameisensäureäthylester. Nach 5Min. wird eine gekühlte Lösung von 13,8g (60 mMol) DL-Phenylalaninäthylester-Hydrochlorid (V) in 30ml Wasser rasch hinzugegeben, 30Min. bei -10° und dann 2Std. ohne Kühlung bis zur Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt und analog zu VII aufgearbeitet. Durch längeres Erhitzen des öligen Produktes mit Äther am Rückfluß erhält man 19g einer festen, z.T. kristallinen Substanz, die aus Methanol/Äther umkristallisiert wird.

Ausbeute: 15,5g (67 % der Theorie)

Schmp. 86-88° Lit. (54) 89-90°

Benzoyloxycarbonylglycyl-L-phenylalanin (XVI)

Eine Lösung von 16,5g (40 mMol) des Dipeptidesters XV in 500ml Aceton wird mit 22ml 2n Natronlauge eine Stunde bei Raumtemperatur intensiv gerührt und analog zu X aufgearbeitet. Es wird im Vakuum eingedampft und aus Essigester umkristallisiert.

Ausbeute: 8,9g (63 % der Theorie)

Schmp. 160-161° Lit. (55) 159,5-160,5°

$C_{19}H_{20}N_2O_5$ MG. 356,4

Ber.: N=7,85 %

Gef.: N=7,88 %

Benzoyloxycarbonylglycyl-D-phenylalaninmethylester (XVII)

Die Darstellung erfolgt analog zu VII aus 12,0g (60 mMol) Dbo-glycin (I) in 500ml Tetrahydrofuran und 16,8ml (2Val) Triäthylamin mit 5,7ml (30 mMol) Chlorameisensäureäthylester und einer gekühlten Lösung von 13,0g (60 mMol) D-Phenylalaninmethylester-Hydrochlorid (IIb) in 30ml Wasser. Es wird in üblicher Weise in Essigester analog zu VII aufgearbeitet. Es verbleibt ein Öl, das sich nicht kristallisieren läßt und gleich verseift wird.

Ausbeute: 20g (87 % der Theorie)

Benzoyloxycarbonylglycyl-L-phenylalanin (XVIII)

Eine Lösung von 20g (ca. 54 mMol) des Rohproduktes XVII in 500ml Aceton wird mit 28ml 2n Natronlauge analog zu X verseift. Das erhaltene ölige Produkt kristallisiert sehr schwer nach längerem Stehen aus Essigester, Äther.

Ausbeute: 10,5g (49 % der Theorie, bezogen auf I)

Schmp. 122-124° Lit. (56) 125-126°

$[\alpha]_D^{25} -39,5^{\circ}$ (c=1; Äthanol) Lit. (56) $[\alpha]_D^{20} -40,2^{\circ}$ (c=2; Äthanol)

$C_{19}H_{20}N_2O_5$ MG. 356,4

Ber.: N=7,85 %

Gef.: N=7,86 %

Benzyloxycarbonylglycyl-L-phenylalaninäthylester (XIX)

Die Darstellung erfolgt analog zu VII aus 10,0g (50 mMol) Cbo-glycin (I) in 200ml Aceton und 13,4ml (110 mMol) Triäthylamin mit 5,7ml (60 mMol) Chlorameisensäureäthylester und einer Lösung von 13,8g (60 mMol) L-Phenylalaninäthylester-Hydrochlorid (Vb) in 30ml Wasser. Das ölige Produkt wird in Essigester aufgenommen, in üblicher Weise gereinigt und im Vakuum eingedampft. Es verbleiben 19g öliges Rohprodukt, das sogleich verseift wird.

Benzyloxycarbonylglycyl-L-phenylalanin (XX)

19g (ca. 50 mMol) des Rohproduktes XIX werden in 500ml Aceton gelöst und mit 56ml in Natronlauge bei Raumtemperatur analog zu X verseift, in üblicher Weise in Essigester gereinigt und im Vakuum eingedampft. Das ölige Produkt kristallisiert sehr schwer aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 11,2g (63 % der Theorie, bezogen auf I)

Schmp. 124-126° Lit. (46) 127°

$[\alpha]_D^{25} +39,0^\circ$ (c=1; Äthanol) Lit. (46) $[\alpha]_D^{18} +41,5^\circ$ (c=2; Äthanol)

$C_{19}H_{20}N_2O_5$

MG. 356,4

Ber.: N=7,85 %

Gef.: N=7,87 %

Benzyloxycarbonyl-DL-phenylalanyl-DL-phenylalaninäthylester (XXI)

Die Darstellung erfolgt analog zu VII aus 7,0g (25 mMol) Cbo-DL-phenylalanin (II) in 200ml Aceton und 7ml (2Val) Triäthylamin mit 2,4ml (25 mMol) Chlorameisensäureäthylester und einer Lösung von 6,0g (26 mMol) DL-Phenylalaninäthylester-Hydrochlorid (V) in 20ml Wasser. Das ölige Produkt wird in Essigester aufgenommen und analog zu VII gereinigt. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum verbleiben 11g eines öligen, z.T. erstarrenden Rohproduktes, das ohne weitere Reinigung verseift wird.

Benzyloxycarbonyl-DL-phenylalanyl-DL-phenylalanin (XXII)

11g (ca. 23 mMol) des Rohproduktes XXI werden in 500ml Aceton gelöst und mit 25ml 1n Natronlauge bei Raumtemperatur 12Std. intensiv gerührt, analog zu X in Essigester aufgearbeitet und durch Zugabe von Petroläther gefällt. Das amorphe Rohprodukt wird mit Äther gekocht und durch Zugabe von Methanol in Lösung gebracht. Nach längerem Stehen im Kühlschrank wird abgesaugt und aus Essigester/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 6,0g (50 % der Theorie bezogen auf II)

Schmp. 137-140° Lit. (57) 138-140°

$C_{26}H_{26}N_2O_5$ MG. 446,5

Ber.: N=6,28 %

Gef.: N=6,22 %

Benzyloxycarbonyl-D- α -phenylglycyl-glycinäthylester (XXIII)

Zu einer Lösung von 11,4g (40 mMol) Cbo-D-phenylglycin (III) in 200ml Aceton und 5,6ml (40 mMol) Triäthylamin werden unter kräftigem Rühren bei -10° 3,8ml (40 mMol) Chlorameisensäureäthylester gegeben. Nach 5Min. wird eine Lösung von 7,0g (50 mMol) Glycinäthylester-Hydrochlorid (IV) und 7ml (50 mMol) Triäthylamin in 20ml wässrigem Aceton rasch hinzugegeben. Die Temperatur steigt auf 0°, und der entstehende dicke Brei wird mit 150ml Aceton verdünnt, 30Min. bei -10° und dann ohne Kühlung auf Raumtemperatur gerührt. Das ausgefallene Aminhydrochlorid wird abfiltriert, die Lösung im Vakuum eingedampft, in viel Essigester aufgenommen (schwer löslich), mit 3%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 1n Salzsäure und Wasser gewaschen. Nach Abtrennung von 2,6g Ausgangsprodukt wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es wird aus Alkohol umkristallisiert.

Ausbeute: 7,0g (47 % der Theorie)

Schmp. 157-158°

$C_{20}H_{22}N_2O_5$ MG. 370,4

Ber.: N=7,57 %

Gef.: N=7,75 %

Benzyloxycarbonyl-D- α -phenylglycylglycin (XXIV)

4,5g (12 mMol) des Dipeptidesters XXIII werden in 500ml Aceton gelöst und mit 14ml 1n Natronlauge bei Raumtemperatur 35Min. mit einem Vibromischer intensiv durchmischt und analog zu X aufgearbeitet. Die Essigesterlösung wird im Vakuum eingedampft. Es wird umkristallisiert durch Lösen in Methanol und Zugabe von Äther und Petroläther.

Ausbeute: 2,8g (68 % der Theorie)

Schmp. 148-150° $[\alpha]_D^{21}$ -80,5° (c=1; Methanol)

C₁₈H₁₈N₂O₅ MG. 342,4

Ber.: N=8,18 %

Gef.: N=8,45 %

Benzyloxycarbonylglycyl-D- α -phenylglycinäthylester (XXV)

Zu einer Lösung von 4,2g (20 mMol) Cbo-glycin (I) in 200ml Aceton und 5,6ml (40 mMol) Triäthylamin werden bei -10° unter kräftigem Rühren 1,9ml (20 mMol) Chlorameisensäure-äthylester gegeben. Nach 5Min. wird eine gekühlte Lösung von 4,3g (20 mMol) D- α -Phenylglycinäthylester-Hydrochlorid (VI) in 20ml Wasser rasch eingegossen, 30Min. bei -10° und dann ohne Kühlung bis zur Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt. Es wird im Vakuum eingedampft, der ölige Rückstand in Essigester unter Zusatz von wenig Alkohol (zur Vermeidung des vorzeitigen Auskristallisierens) aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Nach dem Eindampfen des Lösungsmittels im Vakuum verbleiben 8g eines Öles, das in 100ml Äthanol gelöst wird und im Kühlschrank kristallisiert.

Ausbeute: 5,8g (88 % der Theorie)

Schmp. 106-108° $[\alpha]_D^{25}$ -89,5° (c=1; Äthanol)

Benzyloxycarbonylglycyl-D- α -phenylglycin (XXVI)

Die Verseifung von 5,4g (14,6 mMol) des Dipeptidesters XXV in 300ml Aceton erfolgt mit 15,2ml 1n Natronlauge bei Raumtemperatur mit einem Vibromischer. Die Aufarbeitung wird analog zu X durchgeführt. Die beim Eindampfen der Essigesterlösung im Vakuum auskristallisierende Säure wird aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 2,5g (50 % der Theorie)

Schmp. 190-191° $[\alpha]_D^{20}$ -37,5° (c=1,33; Methanol)

$C_{18}H_{18}N_2O_5$

MG. 342,3

Ber.: N=8,18 %

Gef.: N=8,32 %

Benzyloxycarbonyl-L-alanylglycinäthylester (XXVII)

Die Darstellung erfolgt analog zu XIII aus 8,5g (38 mMol) Cbo-L-alanin in 250ml Aceton und 5,4ml (1Val) Triäthylamin mit 3,6ml (38 mMol) Chlorameisensäureäthylester und einer Lösung von 5,5g (50 mMol) frisch destilliertem Glycinäthylester (freigesetzt aus dem Hydrochlorid IV nach FISCHER) in Aceton. Es wird in üblicher Weise in Essigester aufgearbeitet und aus Essigester/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 8,6g (73 % der Theorie)

Schmp. 97-100° Lit. (58) 100°

Benzyloxycarbonyl-L-alanylglycin (XXVIII)

Die Verseifung von 8,6g (28 mMol) des Dipeptidesters XXVII in 300ml Aceton mit 31ml 1n Natronlauge bei Raumtemperatur erfolgt in 30Min. mit dem Vibromischer. Es wird analog zu X aufgearbeitet und aus Essigester umkristallisiert.

Ausbeute: 5,0g (64 % der Theorie)

Schmp. 126-128° Lit. (59) 127-128°

4. Cbo-Dipeptidpenicilline

6-(Benzyloxycarbonylglycylamido)-penicillansäure (XXIX)

Zu einer Lösung von 6,3g (30 mMol) Cbo-glycin (I) und 4,2ml (30 mMol) Triäthylamin in 250ml Aceton werden bei -10° 2,85ml (30 mMol) Chlorameisensäureäthylester gegeben. Nach 5Min. wird rasch eine gekühlte Lösung von 7,1g (33 mMol) 6-Aminopenicillansäure und 4,6ml (1Val) Triäthylamin in 60ml Aceton und 15ml Wasser eingegossen, 30Min. bei -10° und weitere 90Min. ohne Kühlung auf Raumtemperatur gerührt. Das Aceton wird im Vakuum abgedampft, der Rückstand in 50ml 3%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen, mit 2x100ml Äther ausgeschüttelt, mit 10%iger Phosphorsäure angesäuert (pH 2), das gelbe Öl in 5x100ml Äther extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdampfen des

Äthers im Vakuum wird das schwach gelbliche Öl in 50ml getrocknetem Aceton aufgenommen und mit wenig Äther und viel Petroläther gefällt. Das flockige Produkt wird filtriert, mit Petroläther gewaschen und über Blaugel getrocknet.

Ausbeute: 8,2g (67 % der Theorie)

Schmp. 110° (Zers. unter Blasenbildung) Lit. (2): keine Angaben

Reinheitsgrad: 85 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$

MG. 407,5

Kaliumsalz

8,2g der Säure XXIX werden in 50ml trockenem Aceton aufgenommen, mit 20ml einer 1,4molaren Lösung von Kalium-Äthylhexanoat [hergestellt nach (68) aus 2-Äthylhexansäure und einer äquimolaren Menge Kaliumhydroxid] in Aceton versetzt und die Fällung durch Zugabe von Äther vervollständigt. Nach kurzzeitigem Stehen im Kühlschrank wird das amorphe gelbliche Produkt abfiltriert, mit abs. Äther gewaschen und über Blaugel getrocknet.

Ausbeute: 8,5g (nahezu quantitativ)

Schmp. 90° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheitsgrad: 86 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{KN}_3\text{O}_6\text{S}$

MG. 445,5

Ber.: N=9,43 %

Gef.: N=9,52 %

Variationen der Synthesebedingungen

Analog zu XXIX wird aus 6,3g (30 mMol) Cbo-glycin (I) 1Val Triäthylamin und 2,85ml (30 mMol) Chlorameisensäureäthylester das gemischte Anhydrid gebildet. Nach 5Min. wird eine Lösung von 7,1g (33 mMol) 6-Aminopenicillansäure und 1Val Triäthylamin in 60ml Aceton und 15ml Wasser eingegossen und 30Min. bei -5° gerührt. Der Ansatz wird in vier gleiche Teile geteilt und getrennt analog zu XXIX nach a) 0 Min., b) 30Min., c) 60Min. und d) 90Min. Reaktionszeit bei Raumtemperatur aufgearbeitet.

Ansatz a)	1,9g	(57 % Ausbeute;	86 % Reinheit)
b)	2,1g	(63 % "	79 % ")
c)	2,2g	(67 % "	81 % ")
d)	2,0g	(60 % "	86 % ")

Alle Produkte zeigen im Dünnschichtchromatogramm zwei Flecken mit dem R_F -Wert 0,55 bzw. 0,40. Kristallisationsversuche mit den üblichen organischen Lösungsmitteln und deren Gemischen haben keinen Erfolg.

6-(Benzyloxycarbonylglycylglycylamido)-penicillansäure (XXX)

Zu einer Lösung von 13,2g (50 mMol) Cbo-glycylglycin (VIII) und 7ml (1Val) Triäthylamin in 250ml Tetrahydrofuran werden bei -10° unter kräftigem Rühren 4,75ml (50 mMol) Chlorameisensäureäthylester getropft. Dazu wird nach 10Min. eine auf -2° gekühlte Lösung von 10,8g (50 mMol) 6-Aminopenicillansäure (6-APS) als Triäthylammoniumsalz [hergestellt durch Mischen von 11g 6-APS und 14ml (2Val) Triäthylamin in 250ml Chloroform mit dem Vibromischer und Abfiltrieren von 0,2g ungelöster 6-APS] gegeben, 30Min. bei -5° und 60Min. bei Raumtemperatur gerührt. Es wird analog zu XXIX aufgearbeitet. Das verbleibende Öl wird in Aceton gelöst und mit abs. Äther und Petroläther gefällt und die Fällung durch Zugabe von Äther vervollständigt. Nach dem Waschen mit abs. Äther wird über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 15,7g (68 % der Theorie)

Schmp. 86° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 56 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$

MG. 464,5

Ber.: N=12,05 %

Gef.: N=11,93 %

K-Salz (Darstellung analog zu XXIX)

Schmp. 156° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 52 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{KN}_4\text{O}_7\text{S}$

MG. 502,6

6-(Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanylamido)-penicillansäure
(XXXI)

Zu einer Lösung von 5,0g (17,5 mMol) Cbo-L-phenylalanin und 2,46ml (1Val) Triäthylamin in 200ml Aceton werden bei -10° unter kräftigem Rühren 1,67ml (1Val) Chlorameisensäureäthylester gegeben. Nach 5Min. wird rasch eine gekühlte Lösung von 6,48g (30 mMol) 6-Aminopenicillansäure und 4,2ml (1Val) Triäthylamin in 60ml Aceton und 15ml Wasser eingegossen, 30Min. bei -10° und weitere 90Min. ohne Kühlung auf Raumtemperatur gerührt. Das Aceton wird im Vakuum abgedampft, der Rückstand in 50ml 3%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen, mit 2mal 100ml Äther ausgeschüttelt, mit 10%iger Phosphorsäure auf pH 2 angesäuert in 2mal 100ml Methylisobutylketon extrahiert, erneut in Natriumhydrogencarbonat-Lösung mit Äther ausgeschüttelt, mit Phosphorsäure auf pH 2 angesäuert und in Methylisobutylketon extrahiert. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird im Vakuum eingeeengt und nach Zugabe von 100ml Äther über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Es wird von dem ausgefallenen gelben Produkt (0,2g) abfiltriert und die Lösung mit Petroläther bis zur vollständigen Fällung versetzt.

Ausbeute: 5,0g (57 % der Theorie)

Schmp. 110° (Zers. unter Blasenbildung) Lit.(2):keine Angaben

Reinheitsgrad: 73 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$

MG. 497,6

Ber.: N=8,44 %

Gef.: N=8,60 %

6-(Benzyloxycarbonylglycyl-DL-phenylalanylamido)-penicillansäure, K-Salz (XXXII)

Zu einer Lösung von 7,1g (20 mMol) Cbo-glycyl-DL-phenylalanin (XVI) und 2,8ml (1Val) Triäthylamin in 250ml Aceton werden bei -10° unter kräftigem Rühren 1,9ml (20 mMol) Chlorameisensäureäthylester gegeben. Nach 10Min. wird eine auf -4° gekühlte Lösung von 5,4g (25 mMol) 6-Aminopenicillansäure in 140ml (2Val) 3%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung in

einem Guß hinzugefügt, wobei die Temperatur auf 0° ansteigt. Es wird 30Min. unter Kühlung und weitere 90Min. bis auf Raumtemperatur gerührt, im Vakuum eingeeengt und analog zu XXIX aufgearbeitet. Die Isolierung erfolgt als Kaliumsalz durch Zugabe von einem Überschuß an K-Äthylhexanoat und Fällungen mit Äther.

Ausbeute: 10,2g (85 % der Theorie)

Schmp. 90° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 50 % (NH₂OH-Test)

C₂₇H₂₉KN₄O₇S

MG. 592,7

6-(Benzyloxycarbonylglycyl-L-phenylalanylamido)-penicillan-
säure, K-Salz (XXXIII)

Zu einer Lösung von 7,1g (20 mMol) Cbo-glycyl-L-phenylalanin (XX) und 2,8ml (20 mMol) Triäthylamin in 250ml Aceton werden bei -10° unter kräftigem Rühren 1,9ml (20 mMol) Chlorameisensäureäthylester gegeben. Nach 10Min. wird rasch die gekühlte 6-Aminopenicillansäure (6-APS) als Triäthylammoniumsalz [hergestellt aus 5,4g (25 mMol) 6-APS und 2Val. Triäthylamin in 100ml Chloroform] in mehreren Portionen zugegeben, wobei die Temperatur unter 0° gehalten wird. Es wird dann 30Min. unter Kühlung und 90Min. bis zur Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft, der ölige Rückstand analog zu XXIX in Methylisobutylketon (MIBK) aufgearbeitet. Die getrocknete Lösung wird im Vakuum weitgehend eingeeengt, mit Aceton und mit einem Überschuß von K-Äthylhexanoat versetzt und mit Äther gefällt. Zur Reinigung werden 8,0g des Rohproduktes in Wasser gelöst und nach dem Ansäuern mit Phosphorsäure in MIBK extrahiert; durch Zugabe von 0,1n Natronlauge wird die wässrige Phase auf pH 7 eingestellt und das Kaliumsalz lyophilisiert.

Ausbeute: 6,2g (53 % der Theorie)

Schmp. 100° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 21 % (NH₂OH-Test)

C₂₇H₂₉KN₄O₇S

MG. 592,7

6-(Benzyloxycarbonylglycyl-D-phenylalanylamido)-penicillan-
säure (XXXIV)

Zu einer Lösung von 4,0g (11,2 mMol) Cbo-glycyl-D-phenylalanin (XVIII) und 1,6ml (1Val) Triäthylamin in 250ml Aceton werden bei -10° unter kräftigem Rühren 1,07ml (1Val) Chlorameisensäureäthylester gegeben. Nach 10Min. wird rasch eine gekühlte Lösung von 20 mMol 6-Aminopenicillansäure in 100ml Chloroform und 2Val Triäthylamin in mehreren Portionen zugegeben, wobei die Temperatur unter -4° gehalten wird. Es wird 30Min. bei -10° und 2 Stunden ohne Kühlung gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft, der ölige Rückstand in Methylisobutylketon analog zu XXIX gereinigt, mit Äther und Petroläther gefällt, abfiltriert und über Blaugel getrocknet. Ausbeute: 3,3g (54 % der Theorie)

Schmp. 100° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 65 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$

MG. 554,6

Kaliumsalz

Die Darstellung erfolgt analog zu XXXIII.

Schmp. 135° (Zers.)

Reinheit: 43 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{KN}_4\text{O}_7\text{S}$

MG. 592,7

6-(Benzyloxycarbonyl-DL-phenylalanylglycylamido)-penicillan-
säure, K-Salz (XXXV)

Zu einer Lösung von 5,0g (14 mMol) Cbo-DL-phenylalanylglycin (X) und 1Val Triäthylamin in 200ml Aceton werden bei -13° unter kräftigem Rühren 1,35ml (14 mMol) Chlorameisensäureäthylester gegeben. Nach 10Min. wird eine gekühlte Lösung von 14 mMol 6-Aminopenicillansäure in 200ml Chloroform und 2Val Triäthylamin rasch zugegeben, wobei die Temperatur auf 1° ansteigt. Es wird 30Min. bei -5° und 90Min. ohne Kühlung gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen, das zurückbleibende Öl in Methylisobutylketon analog zu XXIX

gereinigt. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen im Valuum wird in Aceton aufgenommen und mit K-Äthylhexanoat und Äther gefällt. Das schwach gelbliche Kaliumsalz löst sich in heißem Isopropanol und fällt in der Kälte in amorpher Form aus.

Ausbeute: 5,1g (60 % der Theorie)

Schmp. 171° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 70 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{KN}_4\text{O}_7\text{S}$

MG. 592,7

6-(Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanylglycylamido)-penicillan-
säure, K-Salz (XXXVI)

Zu einer Lösung von 6,6g (18,5 mMol) Cbo-L-phenylalanylglycin (XII) und 2,6ml (1Val) Triäthylamin in 250ml Aceton werden bei -15° unter kräftigem Rühren 1,76ml (18,5 mMol) Chlorameisensäureäthylester gegeben. Nach 10Min. wird eine gekühlte Lösung von 4,3g (20 mMol) 6-Aminopenicillansäure in 150ml Chloroform und 2,5Val Triäthylamin rasch zugegeben, wobei die Temperatur nicht über -5° steigt. Es wird 30Min. bei -10° und 90Min. ohne Kühlung bis zur Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, das zurückbleibende Öl in Methylisobutylketon wie bei XXIX beschrieben, gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird in Aceton aufgenommen und das Kaliumsalz mit K-Äthylhexanoat und Äther gefällt.

Ausbeute: 6,0g (55 % der Theorie)

Schmp. $150-160^{\circ}$ (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 55 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{KN}_4\text{O}_7\text{S}$

MG. 592,7

Freie Säure

3,7g Kaliumsalz XXXVI werden in 50ml Wasser gelöst, 2mal mit 50ml Äther (unter Zusatz von wenig Äthanol zur Vermeidung der Emulsionsbildung) gewaschen, mit 10%iger Phosphorsäure auf pH 2 angesäuert, die Säure in 100ml Methylisobutylketon extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und nach dem Ein-

dampfen der Lösung im Vakuum mit Aceton aufgenommen und mit Äther und Petroläther gefällt. 3,0g Säure werden erneut in 50ml Aceton gelöst und mit 500ml Äther (0,6g, 49%ige Reinheit) und anschließend mit 500ml Petroläther (1,9g, 69%ige Reinheit) gefällt. Das mit Petroläther gefällte, gelbliche Produkt ist amorph und gut löslich in den meisten organischen Lösungsmitteln, läßt sich nicht mehr aus einer Aceton-Lösung mit Äther ausfällen und besitzt nach nochmaligem Fällern mit Petroläther keinen höheren Reinheitsgrad.

Schmp. 110° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 69 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$

MG. 554,6

Ber.: N=10,10

Gef.: N=10,12

6-(Benzyloxycarbonyl-D-phenylalanylglycylamido)-penicillansäure, K-Salz (XXXVII)

Zu einer Lösung von 4,0g (11,2 mMol) Cbo-D-phenylalanylglycin (XIV) und 1Val Triäthylamin in 250ml Aceton werden bei -11° unter kräftigem Rühren 1,07ml Chlorameisensäureäthylester gegeben. Nach 10Min. wird eine gekühlte Lösung von 3,2g (15 mMol) 6-Aminopenicillansäure in 100ml Chloroform und 2Val Triäthylamin rasch zugegeben, wobei die Temperatur unter 0° bleibt. Es wird 30Min. bei -5° und 2Std. ohne Kühlung gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen, der ölige Rückstand in Methylisobutylketon analog zu XXIX gereinigt. Die Lösung wird im Vakuum eingeengt und das Kaliumsalz nach Zugabe von Aceton mit K-Äthylhexanoat und Äther gefällt. Gelbliches amorphes Pulver.

Ausbeute: 3,6g (55 % der Theorie)

Schmp. 110° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 67,5 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{KN}_4\text{O}_7\text{S}$

MG. 592,7

Freie Säure

3,5g Kaliumsalz XXXVII werden in 50ml Wasser gelöst, mit Äther gewaschen, auf pH 2 angesäuert, in Methylisobutylketon extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Eindampfen des Lösungsmittels im Vakuum wird der glasartige Rückstand in Aceton gelöst und mit Äther und Petroläther gefällt. Das gelbliche, amorphe Pulver (2,2g) ist in den meisten organischen Lösungsmitteln gut löslich und fällt aus Essigester/Petroläther in der Kälte amorph aus, ohne einen höheren Reinheitsgrad zu bekommen.

Schmp. 173° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 65 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ MG. 554,6

Ber.: N=10,10 %

Gef.: N=10,00 %

6-(Benzyloxycarbonyl-DL-phenylalanyl-DL-phenylalanylamido)-penicillansäure, K-Salz (XXXVIII)

Zu einer Lösung von 4,5g (10 mMol) Cbo-DL-phenylalanyl-DL-phenylalanin (XXII) und 1Val Triäthylamin in 200ml Aceton werden 0,95ml Chlorameisensäureäthylester bei -10° unter starkem Rühren zugefügt. Nach 15Min. wird eine gekühlte Lösung von 3,2g (15 mMol) 6-Aminopenicillansäure in 200ml Chloroform und 2,5Val Triäthylamin rasch hinzugegeben, wobei die Temperatur auf 1° ansteigt. Es wird dann 30Min. bei -10° und 90Min. ohne Kühlung gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum eingedampft, der ölige Rückstand in Methylisobutylketon analog zu XXIX aufgearbeitet. Nach dem Eindampfen des Lösungsmittels im Vakuum wird der ölige Rückstand in Aceton aufgenommen und nach Zugabe von K-Äthylhexanoat mit Äther und Petroläther gefällt. Das gelbliche, amorphe Kaliumsalz ist vor dem Trocknen über Phosphorpentoxid stark hygroskopisch.

Ausbeute: 3,4g (49 % der Theorie)

Schmp. 129° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 53 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{KN}_4\text{O}_7\text{S}$ MG. 682,8

6-[D(-)- α -(Benzyloxycarbonylamino)-phenylacetamido]-penicillansäure, K-Salz (XXXIX)

Die Darstellung erfolgt analog zu der von DOYLE und Mitarb. (4) gegebenen Vorschrift aus 2,2g (7,7 mMol) Cbo-D- α -phenylglycin (III) und 1Val Triäthylamin in 80ml Aceton bei -14° mit 0,73ml (1Val) Chlorameisensäureäthylester und einer vorgekühlten Lösung von 15 mMol 6-Aminopenicillansäure und 1Val Triäthylamin in 30ml Aceton und 20ml Wasser. Es wird 30Min. bei -10° und 60Min. ohne Kühlung gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum eingedampft, der ölige Rückstand in Äther gereinigt. Die Äther-Lösung wird über Natriumsulfat getrocknet und mit K-Äthylhexanoat das Kaliumsalz als Öl ausgefällt. Es wird dekantiert, und nach Zugabe von abs. Äther erstarrt das Öl zu einer gelblichen Masse, die abgesaugt und mit viel Äther gewaschen wird.

Ausbeute: 3,7g (92 % der Theorie)

Schmp. 82° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 72 % (NH_2OH -Test)

$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{KN}_3\text{O}_6\text{S}$

MG. 521,7

6-[D- α -(Benzyloxycarbonylglycylamino)-phenylacetamido]-penicillansäure (XL)

(In der Arbeit verwendete Kurzform: Cbo-glycyl-Ampicillin)

Die Darstellung erfolgt analog zu XXIX aus 4,2g (20 mMol) Cbo-glycin (I) und 1Val Triäthylamin in 250ml Aceton bei -10° mit 1,9ml (20 mMol) Chlorameisensäureäthylester und einer vorgekühlten Suspension von 8,7g (25 mMol) 6-(D- α -Aminophenylacetamido)-penicillansäure (Ampicillin) und 2,1g (1Val) Natriumhydrogencarbonat in 50ml Wasser und 50ml Aceton. Es wird 30Min. bei -10° und dann ohne Kühlung bis auf Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird analog zu XXIX in Essigester aufgearbeitet, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das zurückbleibende erstarrte Öl (10g) wird in Aceton gelöst und mit Äther und Petroläther gefällt.

Ausbeute: 8,5g (74 % der Theorie)

Schmp. 155° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 55 % (NH₂OH-Test) Lit. (64): keine Angaben

C₂₆H₂₈N₄O₇S

MG. 540,5

Ber.: N=10,37 %

Gef.: N=10,33 %

Kaliumsalz

6g der Säure werden in 100ml Aceton unter Zugabe von überschüssigem K-Äthylhexanoat gelöst und durch Zugabe von 200ml Äther und 500ml Petroläther gefällt, abgesaugt und über Blaugel getrocknet.

Ausbeute: 6,2g (93 % der Theorie)

Schmp. 90° (Zers. unter Blasenbildung)

Reinheit: 41 % (NH₂OH-Test)

C₂₆H₂₇KN₄O₇S

MG. 578,6

5. Hydrierversuche an Dipeptiden und Dipeptid-Penicillinen

L-Alanylglycin (XLI)

5,0g (18 mMol) Cbo-L-alanylglycin (XXVIII) werden in 250ml Wasser und 50ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 3g Raney-Ni am Vibrator im Wasserstoff-Durchlauf hydriert, bis die Kohlendioxid-Entwicklung nachläßt und in einer nachgeschalteten Waschflasche mit Bariumhydroxid-Lösung kein Bariumkarbonat mehr ausfällt. Der Katalysator wird abfiltriert, gut mit Wasser ausgewaschen, das Methanol im Vakuum abgezogen, die wässrige Lösung mit 1n Salzsäure angesäuert, mehrmals mit Essigester zur Entfernung des Ausgangsproduktes (1g) ausgeschüttelt und auf pH 5 eingestellt. Beim Einengen fällt ein weißer kristalliner Niederschlag aus der grünlichen Lösung aus. Durch Zugabe von Äthanol wird die Fällung vervollständigt. Es wird aus 80%igem Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1,9g (73 % der Theorie)

Schmp. 231-235° Lit. (65) 232-235°

$[\alpha]_D^{23} +50,6^{\circ}$ (c=2; Wasser) Lit. (65) $[\alpha]_D^{25} +50,6^{\circ}$ (c=2; Wasser)

$C_5H_{10}N_2O_3$

MG. 146,1

Ber.: N=19,15 %

Gef.: N=19,17 %

Glycyl-L-phenylalanin (XLII)

1,8g (5 mmol) Cbo-glycyl-L-phenylalanin (XX) werden in 50ml Methanol und 30ml Wasser gelöst und nach Zugabe von 1g Raney-Ni am Vibrator im Durchlauf hydriert, bis die Kohlendioxid-Entwicklung nachläßt. Der Katalysator wird abfiltriert, gut mit Wasser und Methanol gewaschen, das Methanol im Vakuum entfernt, die wässrige Lösung mit 1n Salzsäure angesäuert, mehrmals mit Essigester gewaschen (0,5g Ausgangsprodukt isoliert), mit 1n Salzsäure auf pH 5 eingestellt und im Vakuum eingedampft. Es bleiben 0,8g eines schwach grünlichen Rohproduktes zurück, das aus 75%igem Äthanol in feinen Nadeln auskristallisiert.

Ausbeute: 0,55g (50 % der Theorie)

Schmp. 260° (Zers.) Lit. (66) 267°

$C_{11}H_{14}N_2O_3$

Ber.: N=12,58 %

Gef.: N=12,20 %

Glycylglycinäthylester (XLIII)

1g (3,3 mmol) Cbo-glycylglycinäthylester (VII) wird in 50ml 50%igem Methanol gelöst und nach Zugabe von 2g Raney-Ni 1Std. bei Raumtemperatur analog zu XLI hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert, gut mit Methanol und Wasser ausgewaschen, das Methanol im Vakuum abgedampft und die Lösung auf 50ml eingeeengt. Die nach dem Stehen über Nacht im Kühlschrank ausgefallenen farblosen Kristalle sind noch verunreinigt

Schmp. 79-81°; Lit. (65) 85-86°. Der Versuch, den Ester nach dem Lösen in 1n Natronlauge alkalisch in Äther oder Chloro-

form zu extrahieren, um dann die Reinigung über das Hydrochlorid zu erreichen, scheiterte, wahrscheinlich wegen der Bildung von Diketopiperazin.

6-(D-~~4~~-Aminophenylacetamido)-penicillansäure (Ampicillin)
(XLIV)

3,0g (5,7 mMol) Cbo-Ampicillin-K (XXXIX) werden in 50ml Wasser gelöst und nach Zugabe von 2g Raney-Ni 1Std. im Wasserstoff-Durchlauf am Vibrator hydriert. Wegen der starken Schaumbildung wird etwas Octanol zugetropft. Der Katalysator wird abfiltriert, mit Wasser gut ausgewaschen, die wässrige Lösung mit 1n Salzsäure auf pH 2 angesäuert, mehrmals mit Äther gewaschen, die wässrige Phase auf pH 4,8 eingestellt und im Vakuum eingeengt. Die bald ausfallenden farblosen Nadeln (1,2g; 75 % Reinheit) werden abgesaugt und aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 0,4g (20 % der Theorie)

Schmp. 198-202° (Zers.) Lit. (4) ca.202°

Reinheit: 93 % (NH₂OH-Test)

$[\alpha]_D^{20} +271^\circ$ (c=0,1; Wasser) Lit. (4) $[\alpha]_D^{21} +283^\circ$ (c=1; Wasser)

C₁₆H₁₉N₃O₄S, H₂O

MG. 367,5

6-(Glycylglycylamido)-penicillansäure (XLV)

2,3g Cboglycylglycin-Penicillin-K(XXX) werden in 50ml Wasser gelöst und nach Zugabe von 3g Raney-Ni 90Min. im H₂-Durchlauf am Vibrator hydriert. Die starke Schaumbildung wird durch einige Tropfen Oktanol verhindert. Der Katalysator wird abfiltriert und gut mit Wasser ausgewaschen, das Filtrat mit verd. Schwefelsäure auf pH 2 gebracht, mit Methylisobutylketon zur Entfernung der Ausgangsverbindung (0,6g) ausgeschüttelt. Es wird mit 3%iger Kaliumhydrogencarbonat-Lösung auf pH 5 eingestellt und im Vakuum auf 10ml eingeengt. Nach mehrstündigem Stehen im Kühlschrank wird die klare, schwach grünliche Lösung lyophilisiert. Das Lyophilisat (1,5g) ist stark hygroskopisch und zeigt im IR bei 1780cm⁻¹ die charakteristische Bande für den β -Lactam-Ring. Die Reinheitsbestimmung nach der Hydroxylamin-Methode liefert wegen der Anwesenheit anorganischer Salze

in unbekanntem Verhältnis einen zu geringen Gehalt an Penicillin. Das freie Penicillin läßt sich aus wässriger Lösung im pH-Bereich 4.0-7.0 nicht mit der 10-fachen Menge Äthanol fällen.

Zum Versuch der Abtrennung der Verunreinigungen und Spaltprodukte durch Gelfiltration werden 1,3g Lyophilisat in 10ml Wasser gelöst und auf eine mit Sephadex^R G 10 gefüllte Chromatographiesäure (2,5 x 27cm) gegeben. Es wird mit Wasser eluiert (12 Tropfen/Min.) und Fraktionen zu 5ml aufgefangen. Die Überprüfung der Fraktionen erfolgt im Dünnschicht-Chromatogramm. Die Fraktionen 10 und 11 enthalten die Hauptmenge der Substanz, jedoch auch die gesamte Menge Sulfat. Die Analyse nach Lyophilisation der beiden Fraktionen ergibt einen viel zu niedrigen N-Wert. Im IR-Spektrum erscheint eine starke Bande bei 1775cm^{-1} . Auch erneute Chromatographie der Fraktionen 10 und 11 bei einer Tropfgeschwindigkeit von 6 Tropfen/Min. zeigt wieder keine Auftrennung von Penicillin und Sulfaten.

6-(Glycyl-L-phenylalanylamido)-penicillansäure (XLVI)

3,0g K-Salz der Cbo-Verbindung XXXIII werden in 150ml Wasser gelöst und nach Zugabe von 3g Raney-Ni analog zu XLI 2 Stunden hydriert. Die auftretende Schaumbildung wird durch einige Tropfen Oktanol beseitigt. Der Katalysator wird abfiltriert und mehrmals mit Wasser ausgewaschen, das Filtrat mit 1n Salzsäure auf pH 2 angesäuert und mit Methylisobutylketon und Äther vom Ausgangsprodukt (0,5g) befreit. Die wässrige Phase wird mit 3%iger Kaliumhydrogencarbonat-Lösung auf pH 5 eingestellt und auf 20ml eingeeengt. Es tritt keine Kristallisation ein. Es wird im Vakuum bei ca. 25° bis zur Trockene eingedampft. Durch Säulenchromatographie an Sephadex^R G 10 (Laufgeschwindigkeit: 6 Tropfen/Min.) wird eine Verteilung des Penicillins über 10 Fraktionen erreicht, sie enthalten jedoch alle 2 Substanzen, deren R_f -Werte im Dünnschicht-Chromatogramm sich von dem R_f -Wert der Ausgangsverbindung unterscheiden. Nach dem Lyophilisieren enthalten die Fraktionen mit dem meisten Penicillin auch die größte Menge Chloridionen. Eine quantitative Reinheitsbestimmung nach der Hydroxylamin-Methode ist also

nicht möglich.

6-(L-Phenylalanyl-amido)-penicillansäure (XLVII)

1,8g Kalium-Salz XXXI werden in 50ml Wasser gelöst und zu einer vorhydrierten Suspension von 2g Raney-Ni gegeben. Wegen des starken Schäumens erfolgt Zugabe von Äthanol (20ml in mehreren Portionen). Nach 2stündigem Hydrieren und Aufarbeiten analog zu XLVI wird im Vakuum auf 30ml eingeengt. Aus der gelblich gefärbten Lösung erfolgt keine Kristallisation auch bei Variation der pH-Werte zwischen 4,0 und 7,0. Das eingedampfte Produkt (1,0g) ist in Wasser sehr gut löslich und läßt sich mit der 10-fachen Menge Äthanol nicht ausfällen. Es zeigt eine positive Hydroxylamin-Reaktion; dünnschichtchromatographisch lassen sich 2 Substanzen unterscheiden.

6-[D-4-(Glycylamino)-phenylacetamido]-penicillansäure (XLVIII)

2,5g K-Salz XL werden in 150ml Wasser gelöst und nach Zugabe von 2g Raney-Ni am Vibrator im H_2 -Durchfluß 90Min. hydriert. Das sofort auftretende Schäumen wird durch Zutropfen von Äthanol beseitigt. Es wird analog zu XLVI aufgearbeitet, bei pH 2 mit Essigester 0,5g der Ausgangsverbindung (57 % Reinheit) isoliert und die wässrige Phase bei pH 4,5 im Vakuum auf 20ml eingeengt. Es tritt keine Kristallisation ein, auch nicht durch Variation des pH-Wertes zwischen 4,0 und 7,0. Durch Zugabe von 100ml Äthanol werden 0,5g eines weißen, amorphen Produktes, das eine positive Hydroxylamin-Reaktion zeigt, ausgefällt. Es ist in Wasser sehr gut löslich und enthält Kaliumchlorid. Das eingedampfte Filtrat (0,2g) zeigt wie die Alkohol-Fällung mehrere Flecken auf dem Dünnschicht-Chromatogramm, die eine positive Jodazid-Reaktion geben. Weitere Reinigungsversuche wurden nicht durchgeführt.

6. Analytische Verfahren

a) Reinheitsbestimmung der Penicilline nach der Hydroxylamin-Methode (23-25)

Hydroxylamin-Lösung: eine Mischung von 1 Vol.-Teil einer 5 molaren wässrigen Lösung von Hydroxylamin-Hydrochlorid mit 4 Vol.-Teilen 90%igem Äthanol wird mit 1 Vol.-Teil Alkalipuffer (86,5g NaOH und 10,3g Na-Acetat auf 500ml Wasser) neutralisiert (8 Stunden haltbar).

Reaktion und Meßvorgang: je 1,0ml einer wässrigen oder alkoholischen Lösung des Penicillins (2-4mg/ml) wird in 2 Reagensgläser pipettiert; in dem einen Glas (Vergleichslösung) wird das Penicillin durch Zugabe von 1 Tropfen 2n Natronlauge hydrolysiert. Nach 10Min. wird die Vergleichslösung mit 1n Salzsäure neutralisiert und in beide Gläser werden 3,0ml der Hydroxylamin-Lösung gegeben. Nach 3Min. (die gebildete Hydroxamsäure ist jedoch mindestens 2 Stunden stabil) wird je 1ml einer Eisenammonsulfatlösung (hergestellt aus 100g $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ und 46,7ml conc. H_2SO_4 auf 500ml Wasser) zugegeben und nach 2-5Min. die Absorption des rot bis braun gefärbten Hydroxamsäure-Eisen (III)-Komplexes gegen die gelbliche Vergleichslösung bei 515nm gemessen.

Eichkurve: aus einer Stammlösung von 500.000 IE (300mg) Standard-Penicillin G-Na (Paul Ehrlich-Institut) in 50ml Wasser werden durch Verdünnen Lösungen von 10^3 bis 10^4 IE/ml hergestellt. Die nach Durchführung der Bestimmung nach der oben angeführten Vorschrift erhaltenen Durchlässigkeitswerte werden in Abhängigkeit von den Konzentrationen [IE/ml] graphisch aufgetragen.

Reinheitsgrad der Penicilline: bei Penicillinen ist diejenige Menge gleich 1 Einheit, die 1 Einheit Penicillin G-Na äquimolar ist. 1 Mol Penicillin G-Na entspricht $5,95 \times 10^8$ IE. Die theoretische Konzentration [IE/ml] einer Penicillinlösung wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Einwaage [mg/ml]}}{\text{Molekulargewicht [mg]}} \times 5,95 \times 10^5 = X \text{ IE/ml}$$

Der Reinheitsgrad ergibt sich dann durch Vergleich des bestimmten Gehalts der Penicillinlösung mit X.

b) Chromatographie

Dünnschichtchromatographie: als Adsorptionsmittel wird Kieselgel GF 254 (Merck) verwendet. Das Laufmittel (30) besteht aus n-Butanol-Eisessig-Wasser-Pyridin (30:6:24:20); es ist einphasig. Die Entwicklungszeit beträgt 1-2 Stunden. Die schwefelhaltigen Penicilline und deren Hydrolyseprodukte werden durch Entfärben von Jodazid (hergestellt durch Lösen von 3,5g Natriumazid in 100g einer 0,1n Jod-Lösung) als helle Flecken auf braunem Grund (Nachweisgrenze 1-2 µg) sichtbar gemacht. Verunreinigungen durch Ausgangsprodukte, Cbo-Aminosäuren oder Cbo-Dipeptide, werden anschließend durch Besprühen der auf 120° erhitzten Platte mit einer gesättigten Lösung von Kaliumdichromat in konz. Schwefelsäure und anschließendes Erhitzen der Platte auf 150° als dunkle Flecken (Nachweis von Verbindungen mit einem Phenyl-Rest) sichtbar gemacht. Die Nachweisgrenze liegt bei 10 µg. Zusätzlich erfolgt noch Sichtbarmachung unter der UV-Lampe.

Präparative Schichtchromatographie: als Adsorptionsmittel wird Kieselgel GF 254 (Merck) verwendet. Die Schichtdicke beträgt ca. 3mm. Eine methanolische Lösung von 0,4g des Cbo-Dipeptidpenicillins XXX wird strichförmig aufgetragen. Die Entwicklungszeit im oben beschriebenen Laufmittelgemisch beträgt ca. 4 Stunden. Nach dem Lufttrocknen werden die nicht sauber getrennten Substanzbänder im UV-Licht lokalisiert, die obere und die untere Zone einzeln abgehoben, mit Aceton eluiert und dünnenschichtchromatographisch untersucht.

Säulenchromatographie: als Adsorptionsmittel dient Sephadex^R G 10 (Fa. Pharmacia, Uppsala). 50g werden in 400ml einer 0,05m NaCl-Lösung über Nacht zur Quellung gebracht, in eine Säule (2,5 x 27cm) unter Rühren eingetropft und chloridfrei gewaschen(17). Es werden 0,5 bis 1g des Penicillins aufgetragen und mit Wasser eluiert.

c) Bestimmung der Sorptionsisotherme.

Die Penicilline werden in einem temperaturkonstanten Raum bei $20^{\circ} \pm 1^{\circ}$ in Exsikkatoren gelagert, die zur Einstellung einer konstanten rel. Luftfeuchtigkeit mit Schwefelsäure oder gesättigten Salzlösungen (mit Bodensatz) gefüllt sind. Folgende Lösungen werden verwendet (68):

1. H_2SO_4	(67%ig)	7 %	rel. Feuchte
2. H_2SO_4	(56,7%ig)	21 %	" "
3. CrO_3		35 %	" "
4. KSCN		47 %	" "
5. $NaBr \cdot 2H_2O$		58 %	" "
6. $CuCl_2$		68 %	" "
7. NH_4Cl		79 %	" "
8. KNO_3		93 %	" "

Die Gewichtszunahme der Proben wird im Abstand von mehreren Tagen solange bestimmt, bis Gewichtskonstanz eingetreten ist. Das Auftragen der erhaltenen Werte gegen die rel. Luftfeuchtigkeiten ergibt die Sorptionsisotherme.

Parallel zu diesen Bestimmungen werden Proben entnommen, von denen nach 24stündigem Trocknen über Phosphorpentoxid der Reinheitsgrad der Penicilline nach der Hydroxylamin-Methode bestimmt wird.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

=====

- 1) F.R.Batchelor, F.P.Doyle, J.H.C.Nayler, G.N.Rolinson,
Nature [London] 183, 257 (1959)
- 2) Brit.P. 873,049, ref.C.A. 57, 7278g (1962)
- 3) F.P.Doyle, J.H.C.Nayler, H.Smith, E.R.Stove,
Nature [London] 191, 1091 (1961)
- 4) F.P.Doyle, G.R.Fosker, J.H.C.Nayler, H.Smith,
J.chem.Soc. [London] 1962, 1440
- 5) E.Auhagen und Mitarbeiter,
Arzneimittel-Forsch. 12, 791 (1962)
- 6) P.Naumann, Arzneimittel-Forsch.12, 984 (1962)
- 7) G.N.Rolinson, S.Stevens, Brit.med.J. 2, 191 (1961)
- 8) D.C.Hobbs, A.R.English, J.med.pharmac.Chem. 4, 207 (1961)
- 9) Brit.P.962.025, ref.C.A. 61, 5658f (1964)
- 10) Brit.P.958.824, ref.C.A. 61, 4361f (1964)
- 11) K.W.Glombitza, Liebigs Ann.Chem. 673, 166 (1964)
- 12) F.Weygand, A.Prox, W.König, Chem.Ber. 99, 1451 (1966)
- 13) A.L.Heard, G.T.Young, J.chem.Soc. [London] 1963, 5807
- 14) H.Determann, Angew.Chemie 75, 1125 (1963)
- 15) U.S.P. 3.140.283 ref.C.A. 61, 8315c (1964)
- 16) L.Novak, J.Weichert, Experientia (Basel) 21, 360 (1965)
- 17) O.Süs, Liebigs Ann.Chem. 571, 201 (1951)
- 18) E.P.Abraham, E.Chain, W.Baker, R.Robinson,
Nature [London] 151, 107 (1943)
- 19) J.R.Johnson, R.B.Woodward, R.Robinson in:H.T.Clarke,
J.R.Johnson u. R.Robinson "The Chemistry of Penicillin,"
Princeton University Press
1949, S.440
- 20) A.D.Holley, R.W.Holley, J.Amer.chem.Soc. 72, 2771 (1950)
- 21) R.L.Peck, K.Folkers in "The Chemistry of Penicillin," S.52

- 22) J.V.Scudi, H.B.Woodruff, in "The Chemistry of Penicillin,"
S.1025
- 23) J.H.Ford, Analytic.Chem. 19, 1004 (1947)
- 24) H.J.Henstock, Nature [London] 164, 139 (1949)
- 25) G.E.Boxer, P.M.Everett, Analytic.Chem. 21, 670 (1949)
- 26) A.O.Niedermeyer, Analytic.Chem.32, 664 (1960)
- 27) K.W.Glombitza, D.Pallenbach, Pharmazie 23, 157 (1968)
- 28) P.A.Nussbaumer, Pharmac.Acta Helvetiae 37, 65 (1962)
- 29) R.Fischer, H.Lautner, Arch.Pharmaz. 294, 66 (1961)
- 30) E.Ehrhardt, F.Cramer, J.Chromatogr. [Amsterdam] 7, 405 (1962)
- 31) Brit.P.902.703, ref.C.A. 58, 5694h (1963)
- 32) Belg.P.622.902, ref.C.A. 59, 7533h (1963)
- 33) Brit.P.978.178, ref.C.A. 62, 7765h (1965)
- 34) B.A.Ekstrom, B.O.H.Sjoberg, Acta chem.scand. 19, 281 (1965)
- 35) J.Porath, P.Flodin, Nature [London] 183, 1657 (1959)
- 36) D.W.Dennen, J.pharmac.Sci. 56, 1273 (1967)
- 37) J.L.Szabo, C.D.Edwards, W.F.Bruce, Antibiotics and
Chemotherapy 1, 499 (1951)
- 38) M.Bergmann, L.Zervas, Ber.dtsch.chem.Ges. 65, 1192 (1932)
- 39) A.Winterstein, B.Hegedüs, B.Fust, E.Böhn, A.Studer
Helv.chim.Acta 39, 229 (1956)
- 40) D.W.Clayton, J.A.Farrington, G.W.Kenner, J.M.Turner
J.Chem.Soc. [London] 1957, 1398
- 41) Z.J.Vejdelek, Collect.Trav.chim.Tchécoslov. 15, 929 (1950)
ref.C. 1952,5726
- 42) Th.Curtius, Ber.dtsch.chem.Ges. 16, 753 (1883)
- 43) H.Vanderhaegle, J.Pharmacy Pharmacol. 6, 55 (1954);
ref.CA.49, 1708j (1955)
- 44) R.A.Boissonas, St.Guttman, P.A.Jaquenoud, J.P.Waller,
Helv.chim.Acta 39, 1422 (1956)

- 45) E.Fischer, W.Schoeller, Liebigs Ann.Chem. 357, 14 (1907)
- 46) G.W.Kenner, R.J.Stedman, J.Chem.Soc. [London] 1952, 2069
- 47) B.F.Erlanger, H.Sachs, E.Brand, J.Amer.chem.Soc. 76,
1806 (1954)
- 48) E.Fischer, Ber.dtsch.chem.Ges. 41, 1292 (1908)
- 49) A.Mc Kenzie, G.O.Wills, J.chem.Soc. [London] 127, 283 (1925)
- 50) O.Süs, Liebigs Ann.Chem. 572, 96 (1951)
- 51) K.Schlöge, F.Wessely, Mh.Chem. 85, 957 (1954)
- 52) E.Fischer, Ber.dtsch.chem.Ges. 34, 433, 2870 (1901)
- 53) O.K.Behrens, D.G.Dohesty, M.Bergmann J.biol.Chemistry 136,
61 (1940)
- 54) G.W.Anderson, R.W.Young, J.Amer.chem.Soc. 74, 5307 (1952)
- 55) H.Neurath, E.Elkins, S.Kaufmann, J.biol.Chemistry 170,
221 (1947)
- 56) W.Lautsch u. Mitarbeiter, Kolloid-Z. 183, 38 (1962)
- 57) F.Wessely, Mh.Chem. 82, 671 (1951)
- 58) W.Grassmann, E.Wünsch, Chem.Ber. 91, 449 (1958)
- 59) F.Weygand, W.Steglich, Chem.Ber. 93, 2983 (1960)
- 60) D.B.P.965.753 ref.CA. 53, 13177h (1959)
- 61) R.W.Chambers, F.H.Carpenter, J.Amer.chem.Soc. 77, 1524 (1955)
- 62) M.Brenner, W.Huber, Helv.chim.Acta 36, 1109 (1953)
- 63) G.Losse, E.Demuth, Chem.Ber. 94, 1762 (1961)
- 64) Niederl.P.6.610.055 ref.C.A. 67, 9922 (1967)
- 65) H.N.Rydon, J.chem.Soc. [London] 1955, 2542
- 66) E.Fischer, W.Schoeller, Liebigs Ann.Chem. 357, 1 (1907)
- 67) H.Determann, O.Zipp, Liebigs Ann.Chem. 649, 203 (1961)
- 68) G.Nemitz, Z.Lebensmittel Unters.u.Forsch. 123, 1 (1963)
- 69) P.Ruggli, H.Dahn, Helv.chim.Acta 27, 1116 (1944)

L e b e n s l a u f

Als Sohn des Landgerichtsrates Dr. Werner Arnold und seiner Ehefrau Elisabeth, geborene Lutze, wurde ich am 17. Januar 1935 in Berlin geboren.

1954 bestand ich an der Ulrich-von-Hutten-Schule in Berlin-Lichtenrade das Abitur und begann im Sommersemester 1954 das Studium der Chemie an der Freien Universität Berlin. Im März 1958 legte ich die Diplom-Vorprüfung ab und begann im Oktober 1960 am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Randolph Riemschneider meine Diplomarbeit über das Thema "Die Synthese verzweigter β -Halogencarbonsäuren unter Verwendung von Malonestersynthesen". Im Januar 1963 bestand ich die Diplomprüfung in Chemie.

Im April 1963 wurde ich wissenschaftlicher Hilfsassistent am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin und arbeite seit dieser Zeit an der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Frömming. Seit September 1965 bin ich wissenschaftlicher Assistent.

